

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDUARDO LUIS ZARDO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INFILTRAÇÃO BACTERIANA NA VEDAÇÃO
DE DIFERENTES SISTEMAS DE IMPLANTES DENTÁRIOS**

CURITIBA
2010

EDUARDO LUIS ZARDO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INFILTRAÇÃO BACTERIANA NA VEDAÇÃO
DE DIFERENTES SISTEMAS DE IMPLANTES DENTÁRIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná para obtenção do Grau de Mestre, área de Concentração: Microbiologia.

Orientadora:

Prof^a Dr^a Vânia Aparecida Vicente

Co-Orientadoras:

Prof^a Dr^a Ida Chapaval Pimentel

Prof^a Dr^a Marília Compagnoni Martins

CURITIBA
2010

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Zardo, Eduardo Luis

Avaliação *in vitro* da infiltração bacteriana na vedação de diferentes sistemas de implantes dentários. / Eduardo Luis Zardo. – Curitiba, 2010. 69 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Vânia Aparecida Vicente

Co-orientadora: Ida Chapaval Pimentel

Co-orientadora: Marília Compagnoni Martins

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Implante dentário endoósseo 2. Infiltração dentária 3. Aderência bacteriana I. Título II. Vicente, Vânia Aparecida III. Pimentel, Ida Chapaval IV. Martins, Marília Compagnoni V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 617.692



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“Avaliação in Vitro da Infiltração Bacteriana em Diferentes Sistemas de
Vedação em Implantes Dentários”**

por

EDUARDO LUIS ZARDO

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia, pela Comissão formada por:**

Profª. Drª. Vânia Aparecida Vicente (presidente)

Profª Drª Andréa Emília Marques Stinghen

Prof. Dr. Jayme Bordini Júnior

Profª Drª Patrícia do Rocio Dalzoto
membro suplente

Curitiba, 09 de setembro de 2010

Dedico,

A Deus, que me deu o sopro de vida e forças inesgotáveis para trilhar meu caminho.

Aos meus pais Marco e Helena, que me possibilitaram formar alicerces fortes para chegar até aqui. Obrigado pelo eterno Amor!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profª Drª Vânia Aparecida Vicente, que vem me possibilitando aquisição de novos conhecimentos ao longo desses anos. Pela paciência e amizade demonstrada e pela valiosa oportunidade para o desenvolvimento deste trabalho, minhas sinceras admiração e gratidão.

À Profª Drª Marília Compagnoni Martins, co-orientadora e importante idealizadora deste trabalho, pelo conhecimento transmitido e contatos necessários para o seu desenvolvimento. Sou bastante grato pela sua amizade.

À Profª Drª Ida Chapaval Pimentel, pela co-orientação nesta dissertação, e pela forma bonita de colocar em palavras os bons conselhos sempre disponíveis.

Às Profªs Drªs Andréa Emilia Marques Stinghen e Patrícia do Rocio Dalzoto, pelas valiosas contribuições concedidas para a melhoria deste trabalho no exame de qualificação. Admiro a forma como vocês, junto com professoras do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (LabMicro) fazem a gestão de um ambiente de trabalho que me acolheu com muito carinho.

Aos meus irmãos Marcelo e Karla, pela compreensão e torcida.

Ao Prof. Ms. Gastão do Valle Nicolau e à empresa SYSTHEX®, pela doação do material utilizado para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Programa de Mestrado, pelos ensinamentos, competência e trabalho.

À Profª Laura Lúcia Cogo do toda equipe do Setor de Bacteriologia do Hospital de Clínicas da UFPR, à Maristela de Paiva, que me acolheram e me ensinaram.

À querida amiga Samarina Braga, meus agradecimentos pela amizade sincera e apoio constante ao longo dos anos. Sem a sua ajuda este trabalho não seria possível.

À Ju pelo exemplo de discernimento e sabedoria. Saiba que sempre terei grande admiração por você!

Às amigas e companheiras do curso de mestrado, Francine Bontorin Silva e Raquel Schier Guerra, pelos bons momentos que vivemos. Vocês têm um valor inestimável.

À Monica Moreira e Diogo Robl, por todo o auxílio e ensinamento sobre métodos de biologia molecular.

À Lisiane Cândido pelo aprendizado mútuo e amizade demonstrada.

Aos colegas do curso de mestrado, André, Angela, Fernanda, Guilherme, Juliana e Paulo, pelo apoio e amizade. Vocês todos têm futuros belos pela frente.

Aos funcionários e professores do Departamento de Patologia Básica pela disponibilidade e atenção prestada.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, pela possibilidade de execução deste trabalho.

Aos pacientes voluntários, por participarem deste trabalho.

À CAPES-REUNI, pela concessão de recurso financeiro.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar *in vitro* a capacidade de infiltração bacteriana através da interface implante/conector protético em sistemas de implantes dentários de conformação hexagonal. Para a obtenção dos isolados bacterianos, amostras de saliva e subgengivais foram coletadas de 4 pacientes voluntários que apresentavam doença periodontal, segundo aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa responsável. Após o cultivo, os micro-organismos isolados foram caracterizados por meio de testes bioquímicos e selecionados para os ensaios *in vitro*. No estudo da infiltração bacteriana *in vitro* foram utilizados um total de 34 modelos de implantes comerciais SYSTHEX®, com os respectivos conectores protéticos de conformações Hexágono Interno (HI) e Hexágono Externo (HE). Os implantes testados receberam 0,1 µL de inóculo contendo mistura dos micro-organismos previamente selecionados, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Streptococcus oralis*, os quais foram introduzidos na região interna do implante. Os respectivos conectores protéticos foram adaptados e fechados seguindo as especificações do fabricante. As unidades foram incubadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) esterilizado durante período máximo de 20 dias, com amostragens diárias visando detectar a presença de crescimento bacteriano por meio turbidez do meio de cultura. Quando na observação de turbidez ou após o período de incubação, as amostras eram fixadas para observação em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com aumentos variando de 20X a 4000X. Ambos os modelos de conexões apresentaram infiltração bacteriana, em intensidades diferentes. Após análise, houve correlação estatisticamente significativa entre a média das maiores distâncias na interface implante/conector protético e o nível infiltração bacteriana. O melhor sistema de selamento entre as conformações estudadas, em relação à infiltração bacteriana, pareceu ser a conformação Hexágono Externo.

Palavras-chave: Implante dentário endósseo, aderência bacteriana, infiltração dentária, microscopia eletrônica.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the *in vitro* bacterial leakage through the interface implant / prosthetic connector in dental implant systems of hexagonal conformation. To obtain bacterial strains, saliva and subgingival samples were collected from four volunteer patients who had periodontal disease, with the approval of the Committee for Research Ethics in charge. After culture, the microorganisms isolated were characterized by biochemical tests and selected for testing *in vitro*. In the study of bacterial penetration *in vitro*, were used a total of 34 models of commercial SYSTHEX® implants, with the respective prosthetic connectors conformations of Internal Hexagon (HI) and External Hexagon (HE). The implants tested received 0.1 mL inoculum containing a mixture of microorganisms previously selected, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Streptococcus oralis*, which were introduced in the inner region of the implant. Their prosthetic connectors were adapted and closed following the manufacturer's specifications. The units were incubated in BHI (Brain Heart Infusion) sterile during a maximum period of 20 days with daily sampling to detect the presence of bacterial growth by turbidity of the culture medium. When the observation of turbidity or after the incubation period, samples were fixed for observation under scanning electron microscopy (SEM) with magnification ranging from 20X to 4000X. Both models showed bacterial leakage of connections, at different intensities. After analysis, there was a statistically significant correlation between the average longer distances at the interface implant / prosthetic connector level and bacterial infiltration. The best system for sealing between the conformations studied in relation to bacterial infiltration appeared to be conformation External Hexagon.

Key words: Endosseous dental implantation, bacterial adhesion, dental leakage, electron microscopy.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Diagrama representando a relação das espécies dentro dos complexos microbiológicos envolvidos na doença periodontal..	17
FIGURA 2 - Implante e respectivo conector protético.....	23
FIGURA 3 - Representação dos passos realizados na metodologia empregada no estudo.....	35
FIGURA 4 - Eletromicrografia do padrão de colonização bacteriana.....	44
FIGURA 5 - Eletromicrografia da micro-fenda implante/conector	45
FIGURA 6 - Relação da contaminação das peças estudadas ao longo do tempo	51
FIGURA 7 - Gráfico mostrando as médias dos espaços formados entre o implante/conector nos modelos estudados	54
FIGURA 8 - Padrão de mensuração do espaço entre implante e conector protético	56
FIGURA 9 - Box Plot mostrando análise estatística ANOVA on Ranks com pós teste de Tukey.....	57

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Provas bioquímicas e critérios utilizados para a caracterização dos isolados de <i>Streptococcus oralis</i> . Diferenciação dos <i>Streptococcus</i> do grupo Viridans..	30
QUADRO 2 - Caracterização bioquímica dos isolados <i>Streptococcus spp.</i>	39
QUADRO 3 - Caracterização bioquímica dos isolados de bacilos gram negativos.	40
QUADRO 4 - Análise quantitativa da infiltração bacteriana a partir de UFC/mL em meio sólido.....	46
QUADRO 5 - Número de amostras de implantes dentários utilizados.....	48
QUADRO 6 - Avaliação da contaminação <i>in vitro</i> das amostras analisadas	49
QUADRO 7 - Análise do espaço entre implante e conector protético através de microscopia eletrônica de varredura	52

LISTA DE SIGLAS

ANOVA - Analysis of Variance

ATCC - American Type Culture Collection

BGN – Bacilo gram Negativo

BHI – Brain Heart Infusion

CGP – Coco gram Positivo

EDS - Espectroscopia de dispersão de energia radioativa

EMB - Eosin Methylene Blue agar

HE – Hexágono externo

HI – Hexágono interno

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MRSA - *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente

PCR – Reação em cadeia da polimerase.

TSBV - Agar de soja tripticaseína-soro de cavalo-bacitracina-vancomicina

UFC/mL – Unidades Formadoras de Colônia por mililitro.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVO	14
	2.1 OBJETIVO GERAL	14
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
	3.1 MICROBIOLOGIA E DOENÇA PERI-IMPLANTAR.....	15
	3.1.1 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	19
	3.1.2 <i>Streptococcus oralis</i>	20
	3.1.3 Microbiota Exógena	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
	4.1. MATERIAL BIOLÓGICO	27
	4.1.1 CRITERIOS DE INCLUSAO UTILIZADOS NA SELEÇÃO DOS PACIENTES.....	27
	4.1.2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	28
	4.1.3. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Streptococcus oralis</i>	29
	4.2.Provas bioquímicas para identificação dos micro-organismos.....	31
	4.3 AVALIAÇÃO DA INFILTRAÇÃO BACTERIANA EM SELAMENTOS UTILIZADOS EM DIFERENTES SISTEMAS DE IMPLANTES.....	32
	4.3.1. AMOSTRAS DE IMPLANTES DENTÁRIOS	33
	4.3.2. Estudo Piloto	36
	4.3.3. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	36
	4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
	5.1 ISOLAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS DA CAVIDADE BUCAL	38
	5.2. AVALIAÇÃO DA INFILTRAÇÃO MICROBIANA NOS SISTEMAS DE IMPLANTE.....	43
	5.2. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO SELAMENTO BACTERIANO NOS DOIS SISTEMAS DE IMPLANTES ESTUDADOS	49
	5.2.1. ANÁLISE DA MICRO-FENDA EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	52
6	CONCLUSÕES.....	58

REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICES.....	66
APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	67
MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	68

1 INTRODUÇÃO

A utilização de implantes dentários vem se tornando mais frequente, fato que se deve ao conceito de ancoragem direta no osso denominada osseointegração, descrita por Brånemark *et al.* em 1969. Para que a terapia com implantes ocorra, mantendo-se a saúde peri-implantar, deve-se levar em consideração alguns fatores relacionados à preparação e planejamento do leito cirúrgico, estabilidade mecânica do implante e carregamento do mesmo sem que ocorra a contaminação bacteriana, pois essa pode resultar numa reação inflamatória. Num primeiro momento esta patologia fica limitada ao tecido mole e sua progressão leva à destruição do tecido ósseo de suporte, podendo levar a perda da osseointegração e consequentemente do implante (LINDHE; KARRING; LANG, 2005).

Os sistemas de implantes consistem de 2 componentes: a parte endóssea (o implante), que é instalado numa primeira fase cirúrgica, e a conexão transmucosa (o conector), o qual é fixado após uma osteointegração bem sucedida para suportar a restauração protética (STEINEBRUNNER *et al.*, 2005). Os principais sistemas de conexão são os hexágonos externo e interno e a conexão cônica, mais conhecida por sistema Cone Morse.

Tem sido postulado que os sistemas hexagonais podem apresentar uma fenda marginal mínima (*gap*), a qual está normalmente associada com inflamação local e perda da crista óssea alveolar, fato ainda não observado nos sistemas de conexão cônica. Uma das hipóteses prevalentes em relação a esse fenômeno é que bactérias da microbiota bucal colonizam a área da micro-fenda durante a cirurgia ou após a colocação do conector, o que pode levar a uma infecção ao longo do tempo (DIBART *et al.*, 2005; BESIMO *et al.*, 1999).

Alguns autores como DIBART *et al.* (2005) e STEINEBRUNNER *et al.* (2005) têm observado a presença de bactérias viáveis na interface entre conector e implante,

as quais são, em sua maioria, anaeróbios estritos, e também podem ser encontrados em biofilmes relacionados com a etiologia de doenças periodontais e peri-implantares.

Estudos têm mostrado que a microbiota das doenças periodontal e peri-implantar é composta por uma gama de micro-organismos bastante semelhante, representada em grande proporção por bacilos gram negativos anaeróbios facultativos e estritos. A colonização em ambas as doenças acontece devido a vários fatores, dentre eles a habilidade de aderência dos micro-organismos em superfícies específicas como implantes de titânio e formação de biofilme (GERBER *et al.*, 2006, STEINEBRUNNER *et al.*, 2005, SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005).

Na ausência desses patógenos também está ausente a doença peri-implantar, entretanto a sua presença não implica em desenvolvimento de doença. A colonização dos implantes que já pode ocorrer de forma precoce, associada a uma higiene deficiente e acúmulo bacteriano intenso, pode favorecer o aparecimento da doença e destruição dos tecidos periodontais e peri-implantares (MANSUR, 2008)

Para que micro-organismos tornem-se parte da microbiota causadora de doença, há necessidade de nichos adequados e mecanismos que permitam sua permanência nesses locais. Mecanismos de retenção potencializam a aderência de determinada espécie e, são ainda facilitados pelas retenções que possam existir (BARBIERI, 2005), o que pode ser exemplificado pelas fendas marginais dos sistemas de implantes.

Dentro deste contexto, é imprescindível que o selamento da micro-fenda conector/implante se dê de forma efetiva, evitando ou diminuindo ao máximo a colonização bacteriana na região, para que se possa manter uma saúde peri-implantar ideal. Pois, quanto mais próxima a localização da micro-fenda com o osso alveolar, maior é a perda óssea esperada uma vez que a infecção pode se espalhar diretamente para essas estruturas, devido ao acúmulo bacteriano intenso.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro*, a eficácia do selamento bacteriano em dois diferentes sistemas de implantes dentários, verificando assim a passagem de micro-organismos de dentro do implante para o meio de cultura externo utilizado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar um modelo de estudo para verificar a infiltração microbiana em sistema de implante *in vitro*;
- Selecionar linhagens biologicamente adequadas para o estudo proposto;
- Avaliar diferentes condições de cultivo para as linhagens selecionadas frente ao modelo proposto;
- Verificar a micro-fenda implante/conector protético e relacioná-la com possível infiltração;
- Avaliar o melhor sistema de selamento.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O conceito de ancoragem direta no osso, sem tecido periodontal circundando a estrutura, chamado de osseointegração foi descrito por BRÅNEMARK *et al.* em 1969, sendo o primeiro relato sobre o uso de implantes osseointegrados de titânio como suporte de prótese dentárias, o que revolucionou a terapia protética odontológica. Segundo ALBREKTSSON *et al.* (1981) a osteointegração significa um contato direto – em microscopia ótica – entre a estrutura óssea e o implante.

Historicamente esse conceito foi bastante questionado pela comunidade científica devido ao fato da metodologia utilizada ser deficiente para a observação direta. Somente ao longo dos anos 1980 esta teoria foi comprovadamente aceita (LINDHE; KARRING; LANG, 2005). Alguns autores postularam que, quando um material metálico é implantado no osso, uma camada de tecido fibroso sempre se desenvolveria sobre a estrutura, não configurando uma região segura para receber prótese dentária. Outros acreditavam ainda, que o contato direto entre implante e o osso seria possível somente se aquele representasse uma estrutura de cerâmica e não de metal. O conceito atual foi possível pelo uso da microscopia eletrônica de varredura e, atualmente, a terapia protética implantar é uma pratica rotineira utilizada ao redor do mundo (SOUTHAM; CHIR; SELWYN, 1970; ALBREKTSSON *et al.*, 1981; CARLSSON *et al.* 1986, LINDHE; KARRING; LANG, 2005).

3.1 MICROBIOLOGIA E DOENÇA PERI-IMPLANTAR

A ecologia microbiana é baseada nas inter-relações entre os micro-organismos e o ambiente em que se encontram. O conceito-chave na ecologia microbiana é o ecossistema (NISHIHARA; KOSEKI, 2004; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). A microbiota bucal tem importante papel tanto na saúde bucal como no desenvolvimento de doenças decorrentes da alteração desse ecossistema (BARBIERI, 2005). Ela

contribui para o desenvolvimento do sistema imune, permitindo a colonização equilibrada de grande variedade de micro-organismos e, pode constituir reservatório de micro-organismos potencialmente invasivos aos tecidos do hospedeiro (BARBIERI, 2005; NEIVA, 2007).

Para que ocorra implantação das doenças bucais como a cárie dentária e doenças periodontal e peri-implantar, é necessária a formação de um biofilme bacteriano, que é definido como uma comunidade de células bacterianas estruturada, enclausurada numa matriz polimérica produzida pelos próprios micro-organismos. O biofilme é também conhecido por desenvolver-se preferencialmente em superfícies inertes e tecidos mortos e ocorrer comumente em dispositivos médicos e odontológicos implantados em tecidos vivos. (MARSH, 1994; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Os biofilmes podem ser formados por uma única ou por diferentes espécies de micro-organismos. No seu processo de formação, uma comunidade microbiana multiespécies, com um patógeno predominante, interage com o hospedeiro, dividindo espaço e recursos disponíveis com outros organismos oportunistas (BARBIERI, 2005).

Em um ecossistema em desenvolvimento, certas espécies são pioneiras na colonização. Essas são posteriormente substituídas por outras espécies após alterar o habitat, fazendo-o tornar-se propício para o desenvolvimento de outros organismos. SOCRANSKY e HAFFAJEE (2005) postularam um esquema da sucessão microbiana na ecologia microbiológica periodontal, seguindo a interação entre bactéria e hospedeiro. Os autores delinearam de forma didaticamente colorida os complexos de micro-organismos envolvidos (FIGURA 1). A colonização inicial parece envolver membros dos complexos amarelo, verde e roxo junto com *Actinomyces spp.* Posteriormente, com o avanço da doença na região periodontal, ocorre a sucessão em que os membros do complexo laranja e então, vermelho tornam-se dominantes.

Estudos têm mostrado que a microbiota das doenças periodontal e peri-implantar é composta por uma gama de micro-organismos bastante semelhante, representada em grande proporção por bacilos gram negativos anaeróbios facultativos e estritos (GERBER *et al.*, 2006, STEINEBRUNNER *et al.*, 2005, SOCRANSKY; HAFFAJEE,

2005). LEE *et al.* (1999) sugeriram que a colonização microbiana em implantes de titânio, sem evidência de inflamação, ocorre da mesma forma que nos dentes naturais. Quando na presença de resposta inflamatória, esta atua como um coadjuvante na suscetibilidade individual para o desenvolvimento periodontite ou peri-implantite destrutivas; uma vez que essa resposta é determinada, em parte, pela composição do biofilme (DYKE, 2007).

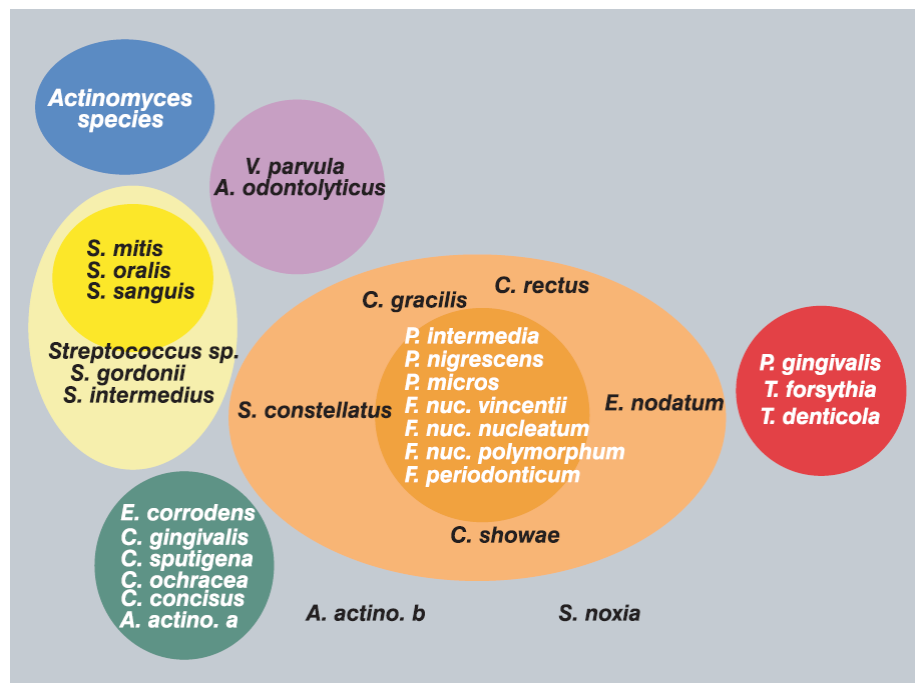


FIGURA 1: Diagrama representando a relação das espécies dentro dos complexos microbiológicos envolvidos na doença periodontal.

NOTA: Os complexos à esquerda, são compostos de espécies que parecem colonizar a superfície dentária e proliferar em estágios iniciais de desenvolvimento do biofilme. O complexo laranja torna-se posteriormente mais dominante em número; em estágios tardios de desenvolvimento da placa, o complexo vermelho torna-se mais dominante. FONTE: SOCRANSKY e HAFFAJEE (2005).

Dados de MEFFERT (1996) comparam as doenças periodontal e peri-implantar, descrevendo que a microbiota na região é bastante semelhante em ambos os casos de saúde ou doença. Em sítios saudáveis, as morfologias de cocos são predominantes e

em processo de doença, grande número de patógenos gram negativos está associado em dentes ou implantes.

MARSH (1994) estudou a microbiologia do biofilme dental e sua relação com as doenças bucais. Segundo o autor, a gengivite está associada com o acúmulo de placa bacteriana ao redor da gengiva marginal. O hospedeiro promove uma resposta inflamatória contra os micro-organismos, e a liberação de fluido crevicular ao redor do sulco gengival é aumentada. Com a continuidade da doença periodontal a microbiota torna-se diversa, representada por bactérias dos gêneros *Aggregatibacter*, *Campylobacter*, *Selenomonas*, *Treponema*, e *Wolinella*. Segundo o autor, destruição tecidual pode resultar diretamente da atividade microbiana e indiretamente da liberação de enzimas lisossômicas durante a fagocitose e produção de citocinas as quais estimulam as células teciduais promovendo a liberação de metaloproteinases.

QUIRYNEN *et al.* (2006) realizaram um estudo prospectivo sobre a dinâmica da colonização subgengival inicial em bolsas peri-implantares. Analisaram 42 pacientes parcialmente edêntulos, através do acompanhamento da colonização durante e após a cirurgia de inserção de implante. As amostras foram analisadas por hibridização DNA-DNA, métodos de cultura e reação em cadeia da polimerase (PCR) para comparação. Apresentaram microbiota complexa, incluindo várias espécies patogênicas, até 2 semanas após a instalação do conector protético. Após 7 dias a frequência de identificação de quase todas as espécies (incluindo bactérias associadas com a periodontite) foi muito próxima entre bolsas peri-implantares e dentes naturais.

LEONHARDT, BERGSTROM E LEKHOLM (2003) avaliaram a prevalência de patógenos associados à doença peri-implantar por diferentes métodos, incluindo a cultura de micro-organismos isolados de dentes naturais e implantes dentários. Os autores utilizaram, também, a técnica de hibridização DNA-DNA e conseguiram estabelecer que o número de indivíduos considerados positivos para a presença desses micro-organismos foi similar em amostras de dentes e implantes quando analisadas pela última técnica. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Streptococcus oralis* foram verificados em ambos os sítios de dentes naturais e implantes endósseos com uma frequência bastante similar. Aquele pode representar um organismo da microbiota

residente em indivíduos que outrora apresentaram doença periodontal, e estar presente em implantes estáveis ou que apresentem peri-implantite.

GERBER *et al.* (2006) sugeriram que a presença de *Poryphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* confere um aumento no risco da periodontite. Estes autores encontraram, através da metodologia de hibridização DNA-DNA, maior proporção de *A. actinomycetemcomitans* em nichos de superfície de implantes dentários quando comparado com superfícies de raízes, onde o *Streptococcus oralis* estava presente em maior proporção. Ambos os micro-organismos apresentaram-se em maior proporção em sítios de bolsa periodontal maior ou igual a 4mm, quando comparados com sítios sem evidência de bolsa periodontal; sendo que *A. actinomycetemcomitans* foi identificado em 42,2% das amostras de tecido gengival e foi mais comumente encontrado em sítios com doença do que outras bactérias. Ao mesmo tempo *A. actinomycetemcomitans*, *P. nigrescens* e *T. denticola* foram mais prevalentes em locais que apresentaram sangramento.

Implantes com falhas de adaptação ou contaminação que apresentaram clinicamente maior mobilidade, radiolucidez e bolsas peri-implantares maiores do que 6mm, estavam associados com periodontopatógenos, incluindo *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, e *P. gingivalis* em mais de um terço dos sítios examinados por análise molecular em estudos realizados BECKER *et al.* em 1990.

3.1.1 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A taxonomia deste micro-organismo sofreu alteração em 2006 (NORSKOV; KILIAN, 2006), criando-se um novo gênero Chamado '*Aggregatibacter*' para conter o micro-organismo anteriormente classificado como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Ao longo do presente trabalho o micro-organismo será referenciado como sendo do gênero *Aggregatibacter*, entretanto não é possível omitir a antiga nomenclatura.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, constituinte da microbiota bucal indígena, é considerado um importante patógeno na doença periodontal em adultos e em pacientes jovens e um dos verdadeiros agentes infecciosos da doença periodontal. Apresenta-se como um bastonete gram negativo, anaeróbico facultativo, e sem motilidade; o sorotipo b é encontrado com mais frequência em pacientes com perdas ósseas mais agressivas (JORGE, 1995; GASPARETTO; ARANA-CHAVEZ; AVILA-CAMPOS, 2000; LINDHE; KARRING; LANG, 2005). Seu tamanho é de aproximadamente $0.4 \times 1.0\mu\text{m}$ (DIBART *et al.*, 2005), e possui genoma de 2.105 megabases (Mb) (DUNCAN, 2005).

Os isolados de *A. actinomycetemcomitans* possuem capacidade de se aderirem às células epiteliais bucais, e quanto maior a sua capacidade de aderência, mais abundante se torna a quantidade de componentes extracelulares, os quais estão diretamente relacionados com a virulência do micro-organismo (GASPARETTO; ARANA-CHAVEZ; AVILA-CAMPOS, 2000). ALVES (2006) verificou que *A. actinomycetemcomitans* está presente em sítios acometidos pela peri-implantite, e a progressão dessa patologia pode seguir os mesmos moldes observados na periodontite agressiva, ou seja, com pequena quantidade de placa bacteriana, pouca inflamação e grande destruição tecidual. Estima-se que uma concentração mínima deste organismo requerida para causar doença seja de 1×10^6 células/mL, presumindo-se que levaria cerca de 2 a 3 semanas para atingir esse valor em condições clínicas (FINE, 2006).

Os métodos para identificação deste patógeno têm suas vantagens e limitações, sendo que a cultura seletiva deste micro-organismo possibilita uma maneira facilmente reproduzível de identificá-lo (SLOTS, 1999).

3.1.2 *Streptococcus oralis*

A bactéria *S. oralis* é um micro-organismo anaeróbico facultativo gram positivo que possui menos de $2\mu\text{m}$ de diâmetro (DIBART *et al.*, 2005). É encontrada significativamente em maior proporção em sítios dentários quando comparado com sítios de implantes de titânio; mesmo assim foi descrito que a ela é encontrada em profundidades de sulco gengival maior ou igual a 4mm (GERBER *et al.*, 2006).

A relação deste gênero com as doenças periodontal e peri-implantar foi proposta com base na análise de cultura e amostras de placa em sítios subgengivais com doença periodontal (LINDHE; KARRING; LANG, 2005).

FRANDSEN, PEDRAZZOLI e KILIAN (1991) investigaram a ecologia do gênero *Streptococcus* na cavidade orofaríngea. Apresentaram que a formação inicial de biofilme está associada com *S. sanguis*, *S. mitis*, e *S. oralis*. O último foi o micro-organismo quase exclusivo na formação.

ALMEIDA *et al.* (2002) analisaram alguns tipos de colônias bacterianas e cada tipo colonial era subcultivado e submetido a testes padrões para identificação. Os autores conseguiram identificar a presença de *S. oralis* tanto *in vitro* como *in vivo* com prevalência variada e mais frequente nos estudos laboratoriais. Verificaram a presença de *S. oralis* e *S. sanguis* oriundos de placas bacterianas com 48 horas de incubação, em cultura sob agitação dos estreptococos do grupo Viridans. Conseguindo retratar a presença desse micro-organismo nos estágios de formação de biofilme bacteriano, indicando a sua importância na microbiota bucal.

3.1.3 MICROBIOTA EXÓGENA

Além da microbiota normal dos tecidos periodontal e peri-implantar, um micro-organismo exógeno que tem se mostrado de interesse clínico nos casos de contaminação operatória é o *Staphylococcus aureus*, bactéria que está presente em 20-30% de indivíduos como colonizador da região nasal, o que o torna um patógeno em potencial nos casos de infecção cruzada no âmbito cirúrgico. Tem sido reportado que o *S. aureus* causa 25% das infecções relacionadas à saúde e contribui substancialmente para a morbidade e custos em hospitais (ABU-TA'A *et al.*, 2008).

Alguns achados relacionando a presença do *S. aureus* em até 70% dos sítios peri-implantares têm mostrado que esse micro-organismo pode ter um papel importante nas infecções em implantes dentários (RENVERT *et al.*, 2008). Casos na literatura como o apresentado por WARD, TERRELL e COLLINS (2008) mostram ser

perfeitamente plausível a contaminação por *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA) em situações de implante osteointegrado envolvido com sinusite, especialmente nos casos de levantamento cirúrgico do seio maxilar. Infecções e lesões em região de cabeça e pescoço desse porte podem representar uma porta de entrada para infecções sistêmicas (RAUTEMAA *et al.* 2007). Portanto, é de fundamental importância a prevenção daquelas infecções, evitando qualquer contaminação microbiana em leito cirúrgico.

3.2 INTERFACE IMPLANTE / CONECTOR PROTÉTICO

O sucesso da terapia peri-implantar depende essencialmente da osseointegração e, para que ela ocorra, é necessária a correta adaptação do implante dentário. Caso o ajustamento entre os componentes do sistema não ocorra de forma adequada, a interface entre o implante e seu respectivo conector protético (*abutment*) apresentará uma fenda marginal mínima, consequentemente o aparecimento de um possível nicho micrométrico é esperado, possibilitando o aparecimento de reações inflamatórias nos tecidos moles que o circundam, devido ao acúmulo bacteriano observado. Esse fator microbiológico está diretamente relacionado com falha na terapia peri-implantar (JANSEN; CONRADS; RICHTER, 1997; FRITZ, 1999).

O conector protético é um pilar onde será adaptada a coroa que irá receber as cargas mastigatórias, transferindo-as ao implante. Ele é adaptado ao implante e fixado com um parafuso submetido a um torque ideal, e mantido na posição adequada (CRAVINHOS, 2003). A fase de justaposição deste elemento protético deve ocorrer sem falhas, para que a sobrevida do elemento implantar no ambiente bucal desponte corretamente (FIGURA 2).

FRITZ (1999) afirmou que as potenciais causas para a deficiência de implantes de duas fases (implante e respectiva conexão) são a peri-implantite, colocação do componente em região de má qualidade óssea e planejamento impróprio, resultando em afrouxamento ou mesmo fratura da peça. Uma vez que a doença inflamatória ocorre

somente na presença de micro-organismos, a possibilidade de acúmulo dos mesmos deve ser evitada ao máximo na micro-fenda.

Um dos fatores mais preocupantes na busca do sucesso em terapias peri-implantares é a interface entre o implante e o conector protético. A falha de adaptação correta é um fator de risco, o qual levará a uma alteração nos parâmetros clínicos e microbiológicos dos tecidos periodontais (CRAVINHOS, 2003; AMARAL, 2003).

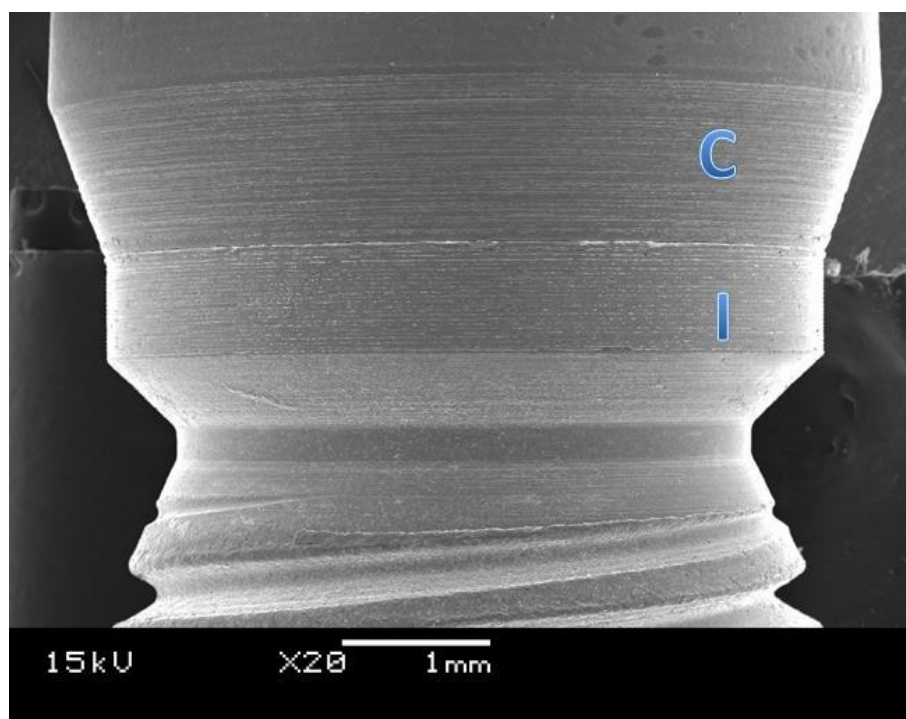


FIGURA 2: Implante e respectivo conector protético.

NOTA: I) Implante Hexágono Externo Ti 5,0 x 8,5 SYSTHEX® C) Conector Cicatrizador Divergente de titânio 5,0 SYSTHEX®. Percebe-se a interface formada entre as duas fases. Microscopia Eletrônica de Varredura, aumento de 20X. FONTE: O autor (2010).

GROSS, ABRAMOVICH e WEISS (1999) apresentaram um estudo comparativo do extravasamento na interface implante-conector, sem a presença de micro-organismos, em 5 modelos de implantes osseointegrados, sendo 3 deles de conformação hexagonal externa. Verificaram que fluidos e pequenas moléculas são

capazes de ultrapassar a interface em todos os sistemas. Presumindo que em situações *in vivo*, metabólitos bacterianos e nutrientes requeridos para o seu crescimento podem passar através da micro-fenda, contribuindo em parte para o mal odor percebido clinicamente e auxiliando no desenvolvimento de peri-implantite.

Segundo BROGGINI *et al.* (2006), a interface implante/conector na crista óssea alveolar está associada com uma substancial inflamação peri-implantar. Os autores buscaram elucidar se a magnitude da inflamação é proporcionalmente dependente da posição do implante. Compararam a distribuição e densidade das células inflamatórias ao redor de implantes fixados em diferentes posições, e conseguiram comprovar que, em todos os casos, desenvolveu-se um padrão similar de inflamação peri-implantar com o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares. Observou-se aumento dessa inflamação quanto mais profundo encontrava-se o implante e, conseqüentemente, a micro-fenda. Portanto, quanto mais próxima a distância entre esta e osso alveolar, maior será a intensidade da inflamação tecidual associada com a perda óssea ao longo do tempo.

JANSEN, CONRADs e RICHTER (1997) verificaram o possível extravasamento de *Escherichia coli* na região do espaço formado entre os dois estágios de implantes e puderam observar, através de estudo *in vitro*, a ocorrência de contaminação microbiana em todas as 13 peças de diferentes combinações implante/conector estudadas. Outro dado importante observado foi a distância do espaço nos sistemas, a qual teve um valor, em média, menor do que 10 µm.

RIMONDINI *et al.* (2001) estudaram a contaminação da região da micro-fenda entre implante e conector através da colocação de 8 implantes dentários de 2 componentes, selados com um anel de silicone e 9 sem o selamento; todos eles instalados em 7 pacientes com boa higiene bucal. Dois meses após a reconstrução protética, os autores removeram coroas e parafusos, e a contaminação orgânica e inorgânica foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise em espectroscopia de dispersão de energia radioativa (EDS). Foi observada contaminação, sugestiva de componentes de cálcio e fosfato, em todas as superfícies analisadas. Contaminação microbiana foi mais frequente no grupo de implantes que não haviam sido selados, mas não foi observado diferenças nos grupos morfológicos bacterianos

entre os implantes selados ou não. Espécies bacterianas morfológicamente representadas por cocos foram as mais observadas. Concluíram que, em situações clínicas, ocorre extravasamento na interface implante/conector, a qual é limitada quando existe boa higiene bucal.

Os sistemas de implantes dentários parafusados, exemplificados pelas conexões hexagonais, são os mais comumente usados para a reabilitação protética. PIATTELLI *et.al*, (2001) compararam *in vitro* a infiltração microbiana e de fluidos na região interna do espaço de sistemas de implantes parafusados e cimentados; uma vez que tem sido observado naqueles, bactérias as quais podem penetrar na cavidade interna como consequência de extravasamento em região implante/conector. Uma alternativa para estes modelos de fixação é representada por implantes que possam receber conectores cimentados. Nestes casos, o conector passa por uma fricção transmucosa através da extensão do implante e é cimentado dentro da porção hexágono interno do mesmo. O estudo realizou-se através da análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) da fenda, análise da penetração de fluidos representada pelo corante azul de toluidina e, de penetração microbiana utilizando o micro-organismo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 em suspensão de cultura diluída em meio líquido. Os resultados indicaram que, em MEV, foi possível observar que, a distância entre o implante e respectivo *conector* foi de 2 a 7 μ m em implantes parafusados e de 7 μ m em peças cimentadas, onde o espaço foi totalmente preenchido por cimento. Em todos os modelos parafusados, houve penetração bacteriana.

Portanto, levando-se em conta os conhecimentos técnico e científico para a utilização de terapia implantar, percebe-se que a vedação ideal nas conexões de sistemas de implantes é um fator imprescindível para que se possa evitar ou diminuir a colonização bacteriana na região da micro-fenda implante/conector protético. Uma vez que a terapia com implantes dentários endósseos tem um grande papel na reabilitação protética ao redor do mundo, a capacidade de empregá-la de forma adequada requer a utilização de técnicas cientificamente seguras para o sucesso. Desta forma, o presente trabalho procura esclarecer algumas questões relacionadas aos fatores microbiológicos e mecânicos na utilização de implantes endósseos. Permitindo a compreensão de como

estes fatores, *in vitro*, podem influenciar a terapia implantar, através da obtenção de dados precisos que sirvam de alicerce para a ciência no desenvolvimento de materiais e técnicas utilizadas nesse ramo da odontologia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas linhagens de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Streptococcus oralis* obtidos a partir de coleta microbiológica de pacientes atendidos na Clínica de Odontologia, do Departamento de Estomatologia do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Todo o procedimento foi realizado de acordo com a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR sob registro CEP/SD: 672.007.09.01 CAAE: 0002.0.091.000-09 (Apêndice). Além disso, foi utilizada linhagem referência do *American Type Culture Collection* (ATCC), de *Staphylococcus aureus* ATCC 27213, gentilmente cedida pela Professora Doutora Ilma Hiroko Higuti, do Departamento de Patologia Básica da UFPR.

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

4. 1.1 CRITERIOS DE INCLUSÃO UTILIZADOS NA SELEÇÃO DOS PACIENTES

Amostras de *A. actinomycetemcomitans* e *S. oralis* foram isoladas a partir de quatro pacientes com doença periodontal instalada, de acordo com alguns critérios de inclusão e exclusão determinados previamente. Para participar da pesquisa os voluntários tiveram que preencher um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice) e estar dentro dos seguintes critérios de inclusão:

- Possuir doença Periodontal Agressiva;

- Possuir mínimo de 6 dentes, com pelo menos 1 sítio interproximal apresentando profundidade de sondagem e nível clínico de inserção maior do que 5mm não contíguos, localizados na região de incisivos e molares.

Foram considerados fatores de exclusão dos voluntários no estudo:

- Ser fumante;
- Estar grávida ou amamentando;
- Ter realizado tratamento periodontal previamente;
- Uso de antibióticos sistêmicos nos últimos 12 meses;
- Ter utilizado antissépticos bucais nos últimos 6 meses;
- Ter histórico de doença sistêmica que comprometa a resposta do hospedeiro.

O exame clínico e a coleta microbiológica foram realizados em pacientes da Clínica de Odontologia, do Departamento de Estomatologia do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (UFPR). O material utilizado para exame clínico e coleta foi jogo clínico (espelho bucal, sonda exploradora e pinça clínica), sonda periodontal milimetrada com marcação tipo Williams e pontas de papel absorvente (# 50 - 70) esterilizados.

4.1.2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Para o isolamento a região gengival era isolada com gaze e limpa a partir da fricção de algodão esterilizado, com intuito de remover biofilme supragengival presente. Cones de papel absorventes eram introduzidos no sítio de coleta por 30 segundos de acordo com o estabelecido por ALVES em 2003.

Em seguida, os cones de papel eram colocados individualmente em tubos de ensaio contendo caldo tioglicolato suplementado com vitamina K e hemina (0,5%) para

isolamento de anaeróbios (Dfco™, B. D., Sparks, USA) e incubados a 36°C por 72 e 120 horas. Após esses períodos de incubação, alíquotas de 0,1mL eram transferidas para placas de Petri contendo 20mL do meio sólido agar BHIS-S - Agar-sangue suplementado para anaeróbios com vitamina K e hemina 0,5% e sangue desfibrinado de carneiro 5%, (Dfco™, B. D., Sparks, USA) segundo MURRAY (2007) e incubadas por mais 120 horas.

As colônias resultantes deste período de incubação foram repicadas em novas placas contendo o meio BHIS-S por estriamento para o isolamento e purificação. Para a identificação presuntiva foi utilizada coloração de Gram. Os bacilos gram negativos foram analisados por provas bioquímicas.

A identificação morfológica aconteceu pela verificação de colônias de 1 a 3mm de diâmetro, bastante aderidas à superfície do agar, com característica peculiar em formato de estrela no centro da colônia observada em microscopia ótica com aumento de 40x (MURRAY, 2007). Realizou-se a observação em microscopia ótica, de cocobacilos gram negativos.

A identificação bioquímica do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* seguiu as provas recomendadas para esta espécie (MURRAY, 2007), compreendendo a prova da catalase, hidrólise de aminoácidos, fermentação de açúcares e provas bioquímicas adicionais, tais como presença ou ausência de fermentação da galactose, maltose, sorbitol, xilose, arabinose, rafinose e ornitina descarboxilase.

Os isolados de *A. actinomycetemcomitans* foram suspensos em caldo BHI com glicerol a 20% e armazenados em freezer a uma temperatura de -80°C, sendo acrescido sangue de carneiro desfibrinado.

4.1.3. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Streptococcus oralis*

Para o isolamento de *S. oralis*, foram coletadas oito amostras de saliva de pacientes por meio de estimulação e diluição em solução salina (NaCl 8,5%) na razão 1:100. Um volume de 0,1 mL da solução homogeneizada em agitador mecânico foi

inoculado por meio do método de semeadura em superfície com auxílio de uma alça de Drigalsky (plaqueamento) em placas contendo o meio Agar Mitis Salivarius com 20% de bacitracina a concentração de 50000µg/mL e telurito de potássio, seletivo para *Streptococcus* do grupo Viridans (GOLD *et al.*, 1973). Em seguida o material foi incubado sob microerofilia (10% CO₂) a 36°C por 48 horas.

Os isolados foram identificados por meio de morfologia e provas bioquímicas, utilizando os critérios de fermentação de açúcares, hidrólise de aminoácidos e reação Voges Proskauer de acordo com KONEMAN *et al.*, em 2001 (QUADRO 1) .

Os isolados de *S. oralis* foram suspensos em caldo BHI com glicerol a 20% e armazenados em freezer a uma temperatura de -80°C.

QUADRO 1- Provas bioquímicas e critérios utilizados para a caracterização dos isolados de *Streptococcus oralis*. Diferenciação dos *Streptococcus* do grupo Viridans.

Grupo Viridans	Hidrólise Arginina	Hidrólise Esculina	Reação VP	Fermentação Manitol	Fermentação Sorbitol	Produção Urease
Grupo mutans	-	+	+	+	+	-
<i>S. mutans</i>						
<i>S. sobrinus</i>						
<i>S. cricetus</i>						
<i>S. rattus</i>						
Grupo sanguis	+	+	-	-	-	-
<i>S. sanguis</i>						
<i>S. parasanguis</i>						
<i>S. gordonii</i>						
<i>S. crista</i>						
Grupo mitis	-	-	-	-	-	-
<i>S. mitis</i>						
<i>S. oralis</i>						
Grupo salivarius	-	+	+	-	-	V
<i>S. salivarius</i>						
<i>S. vestibularis</i>						

NOTA: +: Reação positiva; -: Reação negativa; v: Reação variável. FONTE: KONEMAN *et al.*, 2001.

4.2.PROVAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

4.2.1 Prova da Catalase

A prova foi realizada sobre uma lâmina de vidro, colocando-se peróxido de hidrogênio 3% sobre colônias características crescidas em meio não seletivo, observando-se a formação de bolhas de gás (prova positiva).

4.2.2. Prova da Fermentação do Sorbitol, Manitol, Rafinose, Milibiose, Galactose, Maltose, Xilose e Arabinose

A fermentação de açúcares foi verificada através da adição de 50µL de cultura em meio líquido do micro-organismo, cultivada em meio base caldo BHI (Newprov), contendo o açúcar em questão a uma concentração de 3,4% e indicador de pH (púrpura de bromocresol). Incubação a 37°C por 48horas. A prova foi considerada positiva quando ocorreu a mudança da cor do indicador de pH, de roxo para amarelo.

4.2.3 Prova da Hidrólise da Arginina

Foi adicionado 0,1mL de cultura pura do micro-organismo em meio base caldo BHI, contendo arginina e indicador de pH (púrpura de bromocresol). Incubação a 37°C por 48horas. Inicialmente, o meio muda para amarelo devido à acidificação do indicador de pH pela fermentação da glicose presente no meio. Se a arginina é descarboxilada, pela presença da enzima dihidrolase, um produto final alcalino reverte o indicador para coloração púrpura, indicando reação positiva.

4.2.4 Reação Vermelho de Metila (VM)

Foi semeada a amostra em meio Clark-Lubs (CL) contendo peptona, glicose, fosfato de potássio e água destilada, em pH 7,5. Após incubação a 37°C por 24horas adicionado o corante vermelho de metila. A prova foi considerada positiva quando a coloração do meio, inicialmente amarelo translúcido, tornou-se vermelho.

4.2.5 Reação de Voges-Proskauer (VP)

A fase de semeadura ocorreu semelhante à reação VM e após a incubação, adicionou-se 0,6mL do reagente α -naftol e 0,2mL de hidróxido de potássio 40%. A prova foi considerada positiva quando o conteúdo do tubo ficou vermelho, confirmando a fermentação da glicose, via 2,3-butileno glicol, avaliando a presença de metabólito intermediário acetoína.

4.2.6 Ornitina descarboxilase

Os bacilos gram negativos foram semeados em meio MIO (Newprov) semi-sólido não inclinado. A reação foi considerada positiva quando na coloração amarela do meio.

4.3 AVALIAÇÃO DA INFILTRAÇÃO BACTERIANA EM SELAMENTOS UTILIZADOS EM DIFERENTES SISTEMAS DE IMPLANTES

Para a avaliação da infiltração bacteriana em selamentos utilizados em diferentes sistemas de implantes, foi padronizado um modelo de estudo *in vitro* baseado em modelos descritos por AMARAL (2003), CRAVINHOS (2003) e DIBART *et al.* (2005). As peças testadas eram inoculadas com os diferentes micro-organismos selecionados neste estudo. Os conjuntos implante/conector eram cultivados em meio de cultura líquido, buscando verificar a capacidade de selamento (FIGURA 3).

Medidas para evitar contaminação externa foram tomadas, como desinfecção da bancada do fluxo laminar com álcool 70% e recobrimento da mesma com campos cirúrgicos esterilizados (FIGURA 3). O equipamento foi ligado com luz UV por um período de 15 minutos antes da utilização. Os materiais de vidro e pinças previamente autoclavados. Os operadores estavam paramentados com máscara e gorro, e um deles usando luvas esterilizadas, que eram trocadas a cada peça utilizada.

4.3.1. AMOSTRAS DE IMPLANTES DENTÁRIOS

As peças de implante usadas foram da marca SYSTHEX®, sendo as especificações: Hexágono Interno 5,0 x 7,0 e 5,0 x 10,0 com conector Cicatrizador Divergente alt: 5; e Hexágono Externo Ti 5,0 x 8,5 e 5,0 x 11,5 com Conector Cicatrizador Divergente de titânio 5,0. Todas as peças utilizadas eram esterilizadas de fábrica através da utilização de radiação gama, originárias ao todo de sete lotes diferentes, sendo cinco lotes para as peças de implante, e dois lotes para os conectores.

A habilidade do selamento dos sistemas de implantes foi testada para o extravasamento de micro-organismos inoculados dentro do implante e, os conectores posicionados nos implantes seguindo a aplicação mínima de torque de 40-Newton. Na região interna do implante foi introduzido, utilizando micropipeta calibrada, o volume de 0.1µL do inóculo contendo uma mistura dos micro-organismos *A. actinomycetemcomitans* e *S. oralis*. Estes haviam sido previamente cultivados, separadamente, em meio líquido BHI. Foi realizada a mistura de 0,5mL da cultura pura de cada um dos micro-organismos, em crescimento exponencial, totalizando uma solução estoque contendo 1mL da cultura mista, de onde foi retirado o volume para inóculo. As unidades (os implantes) foram posicionados em tubos de ensaio contendo 10mL do meio de infusão cérebro-coração (BHI) e incubados a 36°C sob microaerofilia com 5% O₂, 10% CO₂ e 85% N₂ (MURRAY, 2007) (FIGURA 3).

As amostras foram analisadas a cada 24 horas por um período máximo de 20 dias verificando a turvação do meio de cultura que indica o crescimento bacteriano. Em seguida realizada a cultura em meios sólidos não-seletivos e seletivos do meio externo visando resgatar o micro-organismo extravasado e o nível de contaminação em unidades formadoras de colônia por mililitro de suspensão (UFC/mL).

Os controles positivos foram obtidos pela contaminação direta do conector protético em caldo BHI contendo as linhagens em questão e inoculação do mesmo no tubo de ensaio contendo 10mL de BHI esterilizado. Para os controles negativos foi

seguido o mesmo procedimento metodológico com a ausência de qualquer micro-organismo.

Anteriormente à incubação dos implantes, foi feito dois testes visando o controle de contaminação (CRAVINHOS, 2003 e AMARAL, 2003) com a utilização de um swab esterilizado na face externa das peças, o qual era então introduzido em meio de cultura líquido e, segundo controle através do mergulho da peça em caldo BHI por 30 segundos (FIGURA 3). Ambos os meios de cultura líquidos utilizados nos controles eram incubado em estufa bacteriológica sob microaerofilia (10% CO₂) a 36°C até a observação de turvação, o que sugeria contaminação. Nestes casos, fez-se novo isolamento do micro-organismo para averiguar se a contaminação havia sido externa ou devido ao extravasamento durante a manipulação. Os casos em que o meio de cultura permaneceu translúcido durante os 20 dias de estudo, foram considerados livres de contaminação.

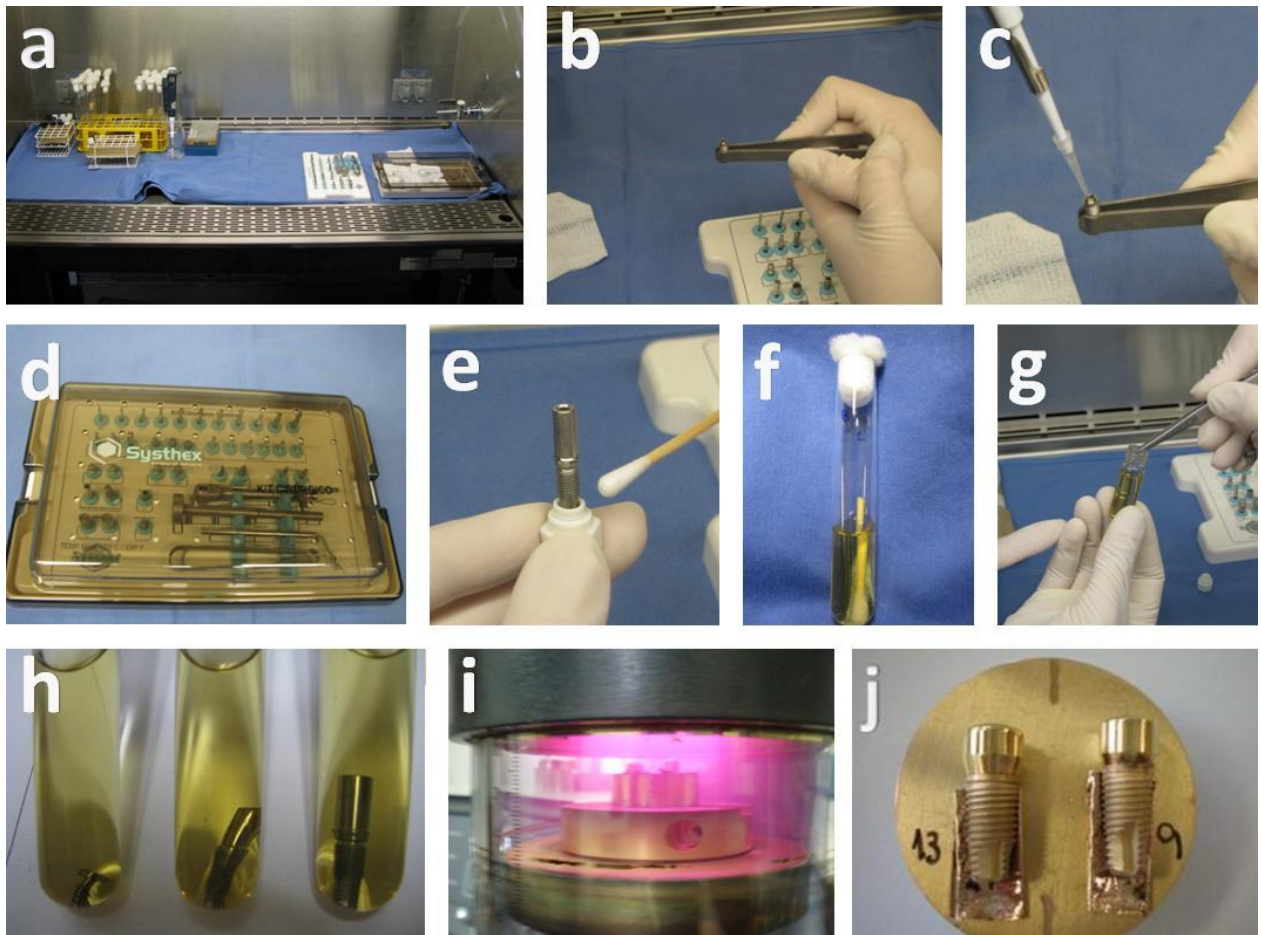


FIGURA 3: Representação dos passos realizados na metodologia empregada no estudo.

NOTA: a) Fluxo laminar com campos cirúrgicos esterilizados; b e c) Peça de implante recebendo inóculo contendo os micro-organismos *A. actinomycetemcomitans* e *S. oralis* (inóculo de 0.1µL); d) Kit cirúrgico SYSTHEX®; e) Primeiro controle de contaminação através de swab esterilizado ao redor da face externa da peça; f) Swab em caldo BHI; g) Segundo controle de contaminação. Peças sendo inoculadas em caldo BHI; h) Peças prontas para serem incubadas sob condições ideais. Observar a translucidez do meio de cultura, pois ainda não apresentavam infiltração; i) Amostras sendo metalizadas no metalizador MED 010 Balzers, do centro de Microscopia Eletrônica da UFPR; j) Duas amostras metalizadas e prontas para visualização em MEV. FONTE: O autor (2010).

4.3.2. ESTUDO PILOTO

Antecedendo o estudo definitivo foi realizado um estudo “piloto” com o intuito de padronização dos passos metodológicos e obtenção de capacidade técnica apurada nos experimentos do projeto.

O micro-organismo de escolha para tal foi o *Staphylococcus aureus* devido à sua relação com problemas de natureza implantar descritos por alguns autores como RENVERT *et al.* (2008) e WARD, TERRELL e COLLINS (2008). As peças de implante usadas foram da marca SYSTHEX®, sendo as especificações: Hexágono Interno 3,75 x 11,5 com Conector munhão 4,3 alt: 1; e Hexágono Externo Ti 5,0 x 8,5 com Conector ucla de titânio 5,0.

A metodologia foi a mesma apresentada, com leituras a cada 24 horas, sendo que o período máximo de leitura foi de 14 dias. Uma vez que o meio de cultura apresentava turbidez, os implantes eram retirados do tubo e fixados para posterior visualização das peças em microscopia eletrônica de varredura.

4.3.3. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Quando da constatação da turbidez no meio de cultura ou após dos 20 dias de estudo, as peças implante/conector foram retiradas dos tubos de ensaio e preparadas para a realização da microscopia eletrônica de varredura.

Todas as peças passaram por uma lavagem com tampão cacodilato de sódio 0,1M, por 3 vezes durante 10 minutos, para remover o meio de cultura, sendo que o tampão apresentava a mesma temperatura do meio para evitar choque térmico.

A fixação foi realizada em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 por 2 horas em temperatura ambiente, ocorrendo lavagem em tampão cacodilato de

sódio 0,1M, 3 vezes de 10 minutos. Em seguida foi feita a desidratação em álcool, utilizando concentrações crescentes a partir de 50% durante 20 minutos, 70%, 90% e finalmente 100% (por 2 vezes durante 20 minutos).

As amostras foram metalizadas no metalizador MED 010 Balzers (FIGURA 3) e então submetidos à observação e análise através de microscopia eletrônica de varredura no microscópio modelo Jeol JSM-6360LV do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados para a análise estatística foram tabulados em planilha Excel 2007 (Microsoft Corporation 1985-2007 – Excel 2007) e posteriormente reorganizados em seção do pacote estatístico SigmaStat, versão Windows 3.5 (Systat software Inc., Erkrath, Germany), onde foram transformados de valores absolutos em valores Log10, para posterior análise.

Realizou-se, inicialmente, verificação de distribuição normal dos dados, pelo teste de Kolgomorov Smirnov. Nos casos de inexistência, optou-se pelo coeficiente de correlação de Spearman, comparando os tratamentos realizados entre os grupos Hexágonos Interno e Externo, a fim de verificar a correlação entre as variáveis. Também foi realizada análise através do teste ANOVA fatorial. Na observação de distribuição normal dos dados, optou-se pelo teste de correlação de Pearson comparando os tratamentos, e pela análise através de ANOVA one-way com pós teste de Holm-Sidak. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS DA CAVIDADE BUCAL

A partir dos diferentes métodos de isolamento utilizados, obteve-se 69 isolados, sendo 23 anaeróbios e 46 microaerófilos. Os isolados foram identificados de forma presuntiva através da análise morfológica após coloração de Gram.

Entre os isolados gram positivos, 19 foram caracterizados como bacilos gram positivos e 43 cocos gram positivos. Entre os cocos gram positivos, a partir do teste da catalase, 37 isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Streptococcus spp.*, os quais foram caracterizados pelos testes bioquímicos apresentados no quadro 2, utilizando os critérios estabelecido por KONEMAN *et al.* (2001).

De acordo com os resultados, 5 isolados foram identificados como *Streptococcus oralis* (St1D, St8D, StA1, StA8 e StA9), os quais não realizaram a fermentação dos açúcares manitol e sortbiol e foram negativos para a reação VP, considerando que, de acordo com a literatura (KONEMAN *et al.*, 2001) a fermentação da rafinose é variável para a espécie em questão. Neste ponto, as amostras que apresentaram reação VP positiva (+) foram excluídas da bateria de testes bioquímicos, uma vez que segundo KONEMAN *et al.* (2001) podem ser pertencentes aos grupos *S. mutans* ou *S. salivarius* (QUADRO 2).

QUADRO 2: Caracterização bioquímica dos isolados *Streptococcus spp.*

Isolados	Fermentação Manitol	Fermentação Sorbitol	Fermentação Rafinose	Reação VP	Hidrólise Arginina	Fermentação Melibiose
St1D*	-	-	+	-	-	-
St8D*	-	-	+	-	-	-
StA1*	-	-	-	-	-	-
StA8*	-	-	-	-	-	-
StA9*	-	-	-	-	-	-
StC3	-	-	+	+	0	0
StP6	+	-	+	+	0	0
StN10	-	-	+	+	0	0
StC1	+	-	+	+	0	0
StM5	-	-	+	+	0	0
StM8	-	-	+	+	0	0

NOTA: Testes bioquímicos de fermentação de açúcares e hidrólise de aminoácidos. (+): reação positiva. (-): reação negativa. (°): testes não realizados nos isolados. (*): Isolados identificados como *S. oralis*. FONTE: O autor (2010).

Dos 7 isolados gram negativos recuperados, todos apresentaram-se como bacilos, com morfologia sugestiva de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (MURRAY, 2007). Após a caracterização bioquímica, observou-se 1 isolado (Gn15/03) identificado como *Actinobacillus hominis*, e 1 isolado (Gn15002) provavelmente pertencente a um dos gêneros *Streptobacillus* ou *Eikenella*. Os outros isolados (GnH, GnJ, GnM, GnO e Gn) foram caracterizados, bioquimicamente, como *A. actinomycetemcomitans* (QUADRO 3).

QUADRO 3: Caracterização bioquímica dos isolados de bacilos gram negativos.

Amostra	Produção de Catalase	Glucose	Galactose	Maltose	Manose	Sorbitol	Arabinose	Rafinose	Ornitina descarboxilase
GnH*	+	+	+	+	+	-	-	-	-
GnJ*	+	+	+	+	+	-	-	-	-
GnM*	+	+	+	+	+	-	-	-	-
GnO8*	+	+	+	+	+	-	-	-	-
GnQ*	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Gn15/02	+	-	-	0	0	0	0	0	0
Gn15/03	+	-	+	+	-	-	-	+	-

NOTA: Testes bioquímicos de fermentação de açúcares e hidrólise de aminoácidos. (+): reação positiva. (-): reação negativa. (°): Teste não realizado. (*): Isolados caracterizados com *A. actinomycetemcomitans*. FONTE: O autor (2010).

A existência de vastos estudos sobre a microbiota da cavidade bucal e faringe mostram que a colonização do e *S. oralis* no biofilme inicia-se a partir da infância e modifica-se somente em razão do desequilíbrio na microbiota bucal, ocorrido na vigência das infecções periodontais (FRANDSEN; PEDRAZZOLI; KILIAN, 1991; ALMEIDA *et al.*, 2002; AGUIAR, 2009). Segundo alguns autores, o *S. oralis* é observado quase que exclusivamente nos dentes e corresponde a 95% dos estreptococos na fase inicial de formação de biofilme (FRANDSEN; PEDRAZZOLI; KILIAN, 1991, ALMEIDA, *et al.* 2002)

No presente estudo foram obtidos 5 isolados de *S. oralis* (45% dos analisados bioquimicamente) corroborando com resultados anteriormente relatados mostrando que *S. mitis*, *S. oralis* e *S. salivarius* são as espécies predominantes das membranas mucosas e da língua do homem (PEARCE *et al*, 1995; SMITH *et al*, 1993; TAPPUNI; CHALLACOMBE, 1993). Segundo alguns autores os *S. sanguinis* e *S. oralis* são comensais habituais da cavidade bucal e estão presentes na formação inicial da placa bacteriana dentária, representando cerca de 80% dos *Streptococcus* desta fase

(SOBRINHO, 1983; HERZBERG, 2000), justificando a presença dos achados durante este trabalho de isolamento de micro-organismos.

ALMEIDA *et al.* (2002) efetuaram experimentos para verificar a capacidade de adesão de sete culturas sob agitação dos estreptococos isolados e mostraram que somente uma cepa de *S. oralis* e uma cepa de *S. sanguis* aderiram às superfícies dos dentes. Possibilitando supor que os mesmos possam, além de fazer parte da microbiota na formação do biofilme dental, aderir às superfícies implantares clinicamente. Segundo os autores, de um total de 86 culturas de *Streptococcus* estudadas, foram encontradas 8,1% de *S. oralis*. Análises das culturas isoladas na última velocidade de agitação usada mostraram que nos experimentos *in vitro* somente *S. oralis* (66,7%) e *S. sanguis* (33,3%) estavam presentes. No experimento *in vivo*, o *S. sanguis* (56,5%) predominou, seguido do *S. oralis* (21,7%), *S. mutans* (15,2%) e outros estreptococos (6,5%).

O isolamento de *A. actinomycetemcomitans* (QUADRO 3) de voluntários que apresentavam doença periodontal agressiva, permite relacioná-lo com as manifestações clínicas da doença. Evidências revelam que o processo de destruição do periodonto envolve o estabelecimento, crescimento e inter-relação de determinados grupos de espécies bacterianas. Portanto, o *A. actinomycetemcomitans* possui papel importante na etiopatogenia das doenças periodontal e peri-implantar (AMARAL, 2003; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005).

GASPARETTO, ARANA-CHAVEZ e AVILA-CAMPOS (2000) isolaram este micro-organismo a partir de amostras do sulco gengival de pacientes voluntários, utilizando os mesmos critérios de inclusão e exclusão adotados no presente estudo. Os autores utilizaram para a coleta o meio de transporte solução Ringer-PRAS, pH 7,2, sob fluxo de CO₂ num intervalo de 2 horas. Em seguida realizavam diluições seriadas a partir da solução de transporte e as mostras eram inoculadas em agar de soja tripticaseína-soro de cavalo-bacitracina-vancomicina (TSBV). Os procedimentos metodológicos, incluindo os critérios de caracterização dos isolados utilizados no presente trabalho foram similares ao realizado por GASPARETTO, ARANA-CHAVEZ e AVILA-CAMPOS (2000), justificando assim os resultados similares de isolamento encontrados nos dois estudos. O presente trabalho demonstrou que os critérios

adotados anteriormente para o isolamento deste micro-organismo eram adequados e demonstraram a importância da identificação presuntiva para o estabelecimento de identificação bioquímica.

MANSUR (2008) apresentou igualmente a presença de *A. actinomycetemcomitans* distribuída entre pacientes desdentados totais (12,3%) e parciais (17%). A metodologia empregada foi semelhante ao presente estudo, salvo pela utilização de TSBV.

Tendo em vista que as doenças que acometem a gengiva têm evolução lenta e não são detectadas rapidamente na clínica, e como são alterações melhor tratadas inicialmente, SLOTS (1999) propôs o uso de testes diagnósticos para ajuda aos profissionais clínicos. Uma vez que a periodontite tem etiologia microbiana, é sensato presumir que o resgate dos micro-organismos causadores pode auxiliar na intervenção terapêutica apropriada. Os espécimes examinados podem implicar, por exemplo, a estimativa da severidade da doença, seu prognóstico e até contribuir na escolha terapêutica medicamentosa no uso de antimicrobianos.

A comparação com o manuseio dos micro-organismos isolados em laboratório mostrou maior facilidade de recuperação e manipulação do *S. oralis* em relação ao *A. actinomycetemcomitans*. Fato que pode ser explicado pela tolerância maior do primeiro ao oxigênio atmosférico e, devido ao maior número de trabalhos descritos na literatura protocolando a metodologia empregada para os fins de manuseio laboratorial.

O isolamento destes micro-organismos, realizado através de métodos de cultivo, ainda é considerado um padrão de referência para a detecção destes, em comparação a outras técnicas como, por exemplo, DNA–DNA hybridization (SOCRANSKY *et al.* 1994) e Real-time PCR (QUIRYNEN, *et al.*, 2006) para determinação da presença de micro-organismos. Dentre as vantagens, pode-se citar a possibilidade de quantificar as espécies isoladas, assim como obter cepas em cultura pura para realização de pesquisas posteriores como a genotipagem, estudos sobre fatores de virulência e, ainda, é o único meio para obtenção do antibiograma. Por outro lado, consiste de etapas laboratoriais exaustivas e onerosas e também, produz menores valores de detecção quando comparada com métodos de detecção baseada nos princípios da

biologia molecular, onde teoricamente números inusitadamente baixos de micro-organismos podem ser detectados (ALVES, 2003; ASHIMOTO *et al.*, 1996).

Portanto, segundo ALMEIDA *et al.* (2002), novos experimentos deveriam ser efetuados, especialmente aqueles baseados em análise genética, com maior poder de discriminação, para permitir determinar e identificar os genótipos e a origem da microbiota estreptocócica e de *Agregaticacter spp.* na formação do biofilme dentário ou implantar, bem como na utilização desses micro-organismos em laboratório.

5.2. AVALIAÇÃO DA INFILTRAÇÃO MICROBIANA NOS SISTEMAS DE IMPLANTE

Com o intuito de avaliar *in vitro* a existência de infiltração microbiana através do espaço formado entre implante e conector protético nos sistemas hexagonais, realizou-se análise quantitativa em meios seletivos a partir do cultivo em meio líquido contendo deferentes sistemas de implante inoculados com os micro-organismos testados. Além disto, foi realizada análise qualitativa por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Inicialmente foi realizado um estudo piloto utilizando a linhagens referência de *Staphylococcus aureus* ATCC 27213 como micro-organismo testado. De acordo com os resultados obtidos verificou-se, através da turvação do meio externo, a existência de infiltração nos dois sistemas avaliados. Por meio de unidades formadoras de colônia UFC/mL em meio sólido, verificou-se a concentração de 10^7 UFC/mL de *S. aureus* a partir dos tubos contendo os conectores infectados, onde nos controles negativo não foi obtido nenhum tipo de crescimento. A partir deste estudo piloto foi demonstrado que a metodologia permite identificar a presença de infiltração caracterizada por meio do extravasamento do inóculo bacteriano do meio interno para o externo. Além disto, de acordo com estes dados preliminares, foi sugerida a existência de infiltração em ambos os sistemas.

Desta forma, estabeleceu-se metodologia adequada para avaliar a existência de infiltração utilizando diferentes tipos de micro-organismos, morfologia (cocos gram negativos e bacilos gram positivos) e dimensão das células bacterianas, divididas em pequena (*A. actinomycetemcomitans*, com tamanho de aproximadamente $0.4 \times 1.0\mu\text{m}$) e média (*S. oralis*, que possui menos de $2\mu\text{m}$ de diâmetro) epidemiologicamente relacionados à doença periodontal (DIBART *et al.*, 2005).

Implantes dos dois sistemas avaliados foram inoculados com os isolados de ambos os micro-organismos de acordo com o item 4.4 da metodologia e cultivados em meio BHI sob condições ideais. A partir do cultivo no meio líquido BHI observou-se a existência de extravasamento dos micro-organismos pela turbidez do meio. Com as imagens realizadas pela MEV, pode-se observar a existência de colonização entre as micro-fendas implante/conector, comprovando assim o extravasamento dos micro-organismos (FIGURA 4). Verifica-se na figura 4b uma distância extrema de $13\mu\text{m}$, caso único encontrado dentre todas as amostras analisadas.

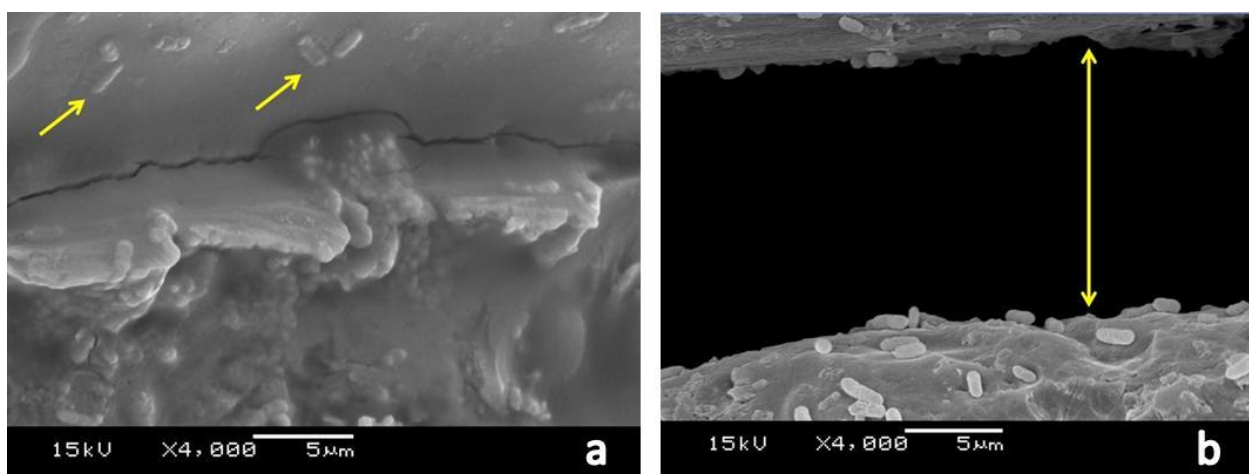


FIGURA 4: Eletromicrografia do padrão de colonização bacteriana.

NOTA: Interface implante/conector em aumento de 4000X. a) Amostra Hexágono Externo Ti $5,0 \times 8,5$ SYSTHEX®. Observa-se a presença bacteriana de bacilos (seta). Espaço com cerca de $0,2\mu\text{m}$ b) Amostra Hexágono Interno $5,0 \times 7,0$ SYSTHEX®. Observa-se a presença de bacilos sobre a superfície do implante. Espaço peculiar encontrado, formado com cerca de $13\mu\text{m}$ (seta). Obs.: Ambas as microscopias ilustram preferencialmente a colonização bacteriana. FONTE: O autor (2010).

De acordo com o observado na figura 4, verificou-se em princípio presença de bacilos, sugerindo o extravasamento da bactéria *A. actinomycetemcomitans*. Tal fato pode sugerir que este micro-organismo permaneceu viável no sistema de simbiose estabelecido dentro da região inoculada. De todas as amostras testadas, foi verificada a existência de células sugestivas de cocos em somente uma amostra em MEV (FIGURA 5).

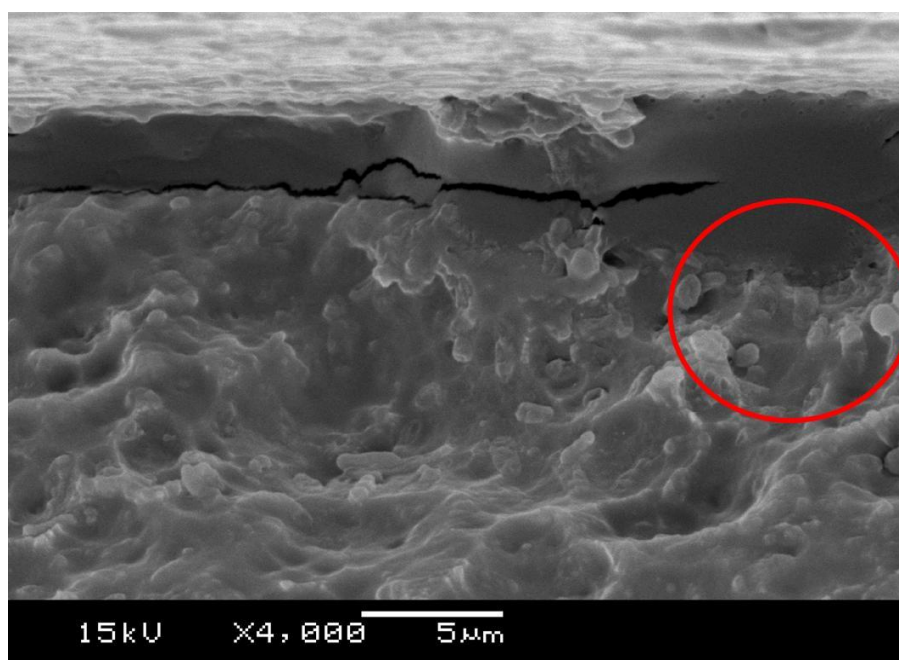


FIGURA 5: Eletromicrografia da micro-fenda implante/conector.

NOTA: Peça de implante/conector Hexágono Interno 5,0x7,0 SYSTHEX®, em aumento de 4000X. Observa-se dentro do círculo imagem sugestiva de células bacterianas em formato de cocos. FONTE: O autor (2010).

A análise quantitativa dos dois sistemas avaliados confirmou a predominância de bacilos gram negativos (BGN) no meio externo. O quadro 4 mostra a média da concentração microbiana em UFC/mL encontrada no reisolamento e purificação das colônias encontradas a partir do meio líquido contendo as peças implantares. Todas as colônias isoladas eram de BGN, sugerindo que a bactéria *A. actinomycetemcomitans*

extravasava com maior intensidade em relação à *S. oralis*. Tal fato pode sugerir que a bactéria *A. actinomycetemcomitans* estaria mais adaptada à condição de cultivo utilizada nos modelos experimentais, o que provavelmente possibilitou maior proliferação bacteriana e consequente extravasamento do meio interno para o externo.

Este dado parece sugerir que o crescimento em conjunto destes micro-organismos, nas condições extremas de simbiose formadas na região de aprisionamento bacteriano dentro do implante, pode possibilitar maior desenvolvimento de um micro-organismo em relação ao outro. Tal fato pode se justificado devido ao potencial de patogenicidade do *A. actinomycetemcomitans*, o qual está fortemente vinculado à manifestação clínica das doenças periodontais e periimplantares, como apresentado por alguns autores (GASPARETO *et al.*, 2000; NISHIHARA; KOSEKI, 2004; LINDHE; KARRING; LANG, 2005). Entre os fatores de virulência do *A. actinomycetemcomitans*, são primordiais a aderência bacteriana aos dentes e/ou às superfícies mucosas, produção de bacteriocinas, fatores imunossupressores, collagenases, fatores de inibição quimiotática e endotoxinas (MARSH, 1994; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; GASPARETO *et al.*, 2000; LINDHE; KARRING; LANG, 2005; NISHIHARA; KOSEKI, 2004).

QUADRO 4: Análise quantitativa da infiltração bacteriana a partir de UFC/mL em meio sólido.

Conexões protéticas	Concentração microbiana em agar BHI	Concentração microbiana em agar EMB	Concentração microbiana em agar MS
H.I.	10,8.10 ⁸ UFC/ml	9.10 ⁸ UFC/ml	-
HE	9,3.10 ⁸ UFC/ml	18.10 ⁸ UFC/ml	-

p = N/S

NOTA: Aspecto da concentração microbiana no extravasamento dos micro-organismos. HI: Sistema de implante hexágono interno. HE: Sistema de implante hexágono externo. BHI: Agar Infusão Cérebro Coração. EMB: Agar Teague. MS: Agar Mitis Salivarius. N/S: Valor *p* não significativo. FONTE: O autor (2010).

Os resultados ainda demonstraram uma disparidade na quantidade do extravasamento bacteriano observado nos diferentes sistemas avaliados de forma estática (*in vitro*), sugerindo que no sistema HI a infiltração parecia menor que no sistema HE, quando observado o crescimento colonial em agar seletivo (EMB), diferentemente do agar não seletivo (BHI) como pode ser visto no quadro 4. No entanto, não houve diferença significativa entre as concentrações bacterianas nos meios de cultura sólidos entre os grupos Hexágono Interno e Hexágono Externo, tanto para o meio BHI, quando para o meio EMB (QUADRO 4). Demonstrando assim que, num modelo de estudo estático, ambos os sistemas apresentam infiltração bacteriana independente da quantidade de extravasamento.

A concentração bacteriana encontrada foi acima da necessária para causar doença periodontal, segundo FINE (2006), mostrando que se os valores forem semelhantes, *in vivo*, é possível a instalação do processo patológico. Dados recentes da literatura não relacionam a infiltração bacteriana com a concentração de micro-organismos extravasados, tornando esse dado peculiar, mesmo que sem relevância estatística.

As peças de implante/conector protético foram metodologicamente testadas através de controles de contaminação descritos no item 4.3. deste trabalho; as que apresentaram contaminação bacteriana foram excluídas do estudo. O quadro 5 apresenta o número de amostras viáveis nos grupos estudados. Estes dados mostram que, mesmo com assepsia recomendada e bons métodos de manipulação, ocorreu contaminação em ambos os controles padronizados, sustentando a hipótese de que qualquer manipulação *in vivo* no leito cirúrgico de peças implantares é plausível de contaminação microbiana (DIBART *et al.*, 2005; BESIMO *et al.*, 1999).

Na presença de contaminação dos controles utilizados, foi realizado o reisolamento do micro-organismo para confirmar a procedência deste. No quadro 5, estão sumarizados os resultados dos controles de contaminação durante a manipulação das peças. Ao todo foram inoculados 20 implantes (10 Hexágonos Interno e 10 Hexágonos Externo). A verificação de contaminação mostrou que 4 implantes (2 Hexágonos Interno e 2 Hexágonos Externo) foram contaminados durante a

manipulação. A micromorfologia das células contaminantes revelou serem 2 cocos gram positivos e 2 bacilos gram negativos, não caracterizando contaminação externa e, sim, vazamento das bactérias na hora da preparação das peças implantares.

QUADRO 5: Número de amostras de implantes dentários utilizados.

	H.I.	H.E.
Número de implantes viáveis	8	8
Número de peças contaminadas na manipulação - Controle I	2 [£]	-
Número de peças contaminadas na manipulação - Controle II	-	2 ^β

NOTA: H.I.: Conexão protética hexágono interno. HE: Conexão protética hexágono externo. £: Ambos os micro-organismos contaminantes foram cocos gram positivos. β: Ambos os micro-organismos contaminantes foram bacilos gram negativos. FONTE: O autor (2010).

A utilização de duas formas diferentes de controle de contaminação parece ser mais eficaz que o uso de um único controle, pois torna a técnica mais sensível à detecção de contaminação bacteriana.

Esses resultados permitem colocar que procedimentos de desinfecção, envolvendo o uso de antimicrobianos prévios a procedimentos regenerativos cirúrgicos são de grande valia para a diminuição do número de micro-organismos no leito cirúrgico e, conseqüentemente, de possível infecção (MEFFERT, 1996)

5.2. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO SELAMENTO BACTERIANO NOS DOIS SISTEMAS DE IMPLANTES ESTUDADOS

O extravasamento de micro-organismos testados a partir da região interna dos implantes para a externa durante os 20 dias (480 horas) de estudo apresentou uma percentagem de 87,5% de contaminação para o grupo hexágono interno (HI) e 50% para o grupo hexágono externo (HE) (QUADRO 6)

A média de dias em que foi verificada a contaminação de cada amostra estudada foi de 4,8 dias no grupo H.I. e 9,25 dias para o grupo H.E. (QUADRO 6)

O índice de contaminação/dia foi realizado através da somatória do quociente do número de implantes contaminados pelo dia em que se deu a contaminação, para averiguar a intensidade em que esta ocorreu ao longo dos dias de estudo (AMARAL, 2003). Os dados deste índice podem ser vistos no quadro 6, os quais apresenta valores mais próximos de 0 (zero) quanto mais eficaz é o selamento.

QUADRO 6: Avaliação da contaminação *in vitro* das amostras analisadas.

Grupo	Porcentagem de extravasamento	Média de dias	Índice Contaminação/dia
H.I.	87,5%	4,8	0,125
H.E.	50%	9,25	0,108
$p = \text{N/S}$			

NOTA: Resultados das análises da percentagem de peças que apresentaram extravasamento bacteriano; média de dias em que ocorreu a contaminação e o índice de contaminação/dia. N/S: Valor p não significativo. FONTE: O autor (2010).

Estes dados mostraram que ambos os sistemas de implante de conformação hexagonal estudados apresentaram alguma evidência de extravasamento de micro-organismo em diferentes graus. Estudos similares apresentaram resultados relativamente parecidos, como o observado por CRAVINHOS (2003), que estudou o

extravasamento em 3 grupos de implantes dentários (2 com conexão hexagonal interna), onde a porcentagem de extravasamento foi de 87,5% em ambos os grupos H.I. AMARAL (2003) observou resultados semelhantes no grau de extravasamento bacteriano em implantes de conformação hexagonal externa, segundo o autor, a única peculiaridade foi encontrada na marca comercial SERSON®, a qual apresentou porcentagem de contaminação de implantes de 20%; curiosamente este era o único implante avaliado que tinha sua conexão protética com encaixe interno, diferindo dos resultados encontrados no presente estudo.

Diferentemente, os resultados para o grupo de implantes HE demonstraram um grau de contaminação de 50%, mostrando que ao longo do período estudado, somente metade das amostras viáveis apresentaram turbidez no meio de cultura. Corroborando parcialmente com os dados encontrados por CRAVINHOS (2003), que relatou a porcentagem de contaminação de 71,43% das amostras hexagonais externas, ainda assim, valor menor do que o encontrado em peças H.I. Estes dados foram estatisticamente insignificantes ($p>0,05$) segundo teste de correlação de Spearman.

PIATELLI *et al.* (2001) observaram contaminação bacteriana em todas as 6 peças de implantes rosqueados de 2 estágios analisadas *in vitro* pela colonização de *Pseudomonas aeruginosa*. Porém, os autores não relataram o grau de contaminação ao longo dos dias. Concomitantemente, foram analisadas 6 peças de implantes cimentados e, nestes últimos, não perceberam sinais de infiltração bacteriana. A cimentação do conector protético representa uma alternativa para a reabilitação protética peri-implantar, que merece ser avaliada em estudos longitudinais.

DIBART *et al.* (2005) realizaram estudo semelhante investigando o selamento bacteriano em implantes BICON® (Boston, MA) com *design locking taper*. As amostras receberam inóculo bacteriano e foram incubadas por 3 dias. Após o período de incubação, não foi observada presença bacteriana na interface implante/conector em nenhuma das amostras. De acordo com os autores, este fato está provavelmente associado com a conformação da interface implante/conector protético neste modelo de conexão. Outro fator que levou a tais resultados foi o tempo de incubação,

relativamente curto, uma vez que a infiltração bacteriana pode ocorrer em tempos maiores do que 72 horas.

JANSEN, CONRADs e RICHTER (1997) testaram 13 amostras de diferentes conexões, e observaram que todos os sistemas de implantes, tanto os de conexão interna quanto externa apresentaram contaminação bacteriana visível, porém os autores trataram um conector protético com silicone e conseguiram verificar que este obteve índices de contaminação inferiores aos demais, estatisticamente significativos.

Seguindo a análise feita por AMARAL (2003), o presente estudo reproduziu um índice de contaminação, independente do percentual de implantes contaminados, levando em consideração os momentos da contaminação (QUADRO 6), ou seja, quanto maior o número de implantes contaminados em um dia próximo ao início do experimento, maior o índice de contaminação/dia. Os resultados mostraram que o grupo H.I. obteve mais amostras contaminadas em menor tempo, configurando relação direta entre esses fatores.

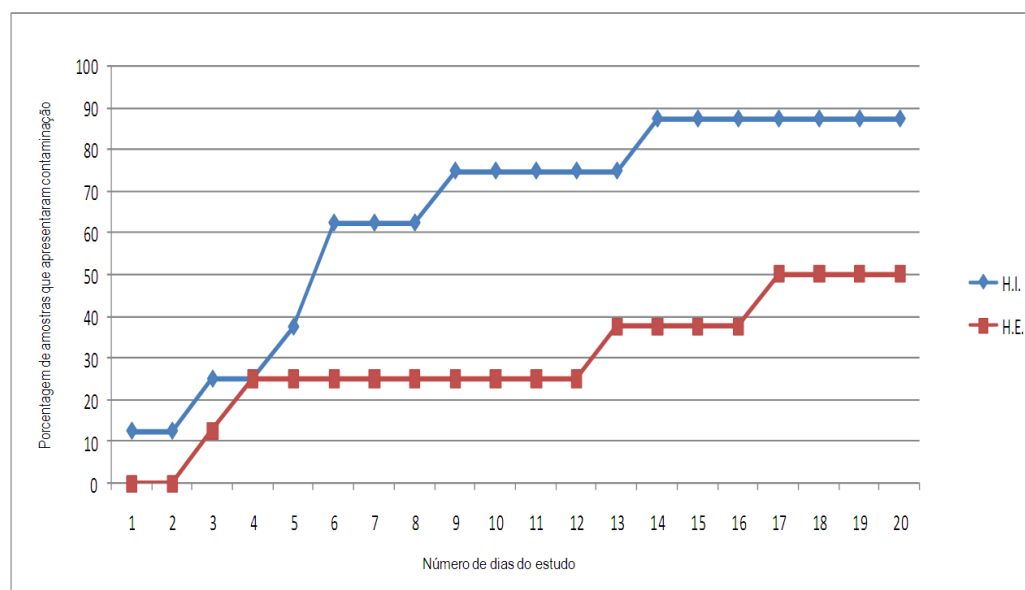


FIGURA 6 : Relação da contaminação das peças estudadas ao longo do tempo.

NOTA: HI: Hexágono Interno. HE: Hexágono Externo. FONTE: O autor (2010).

A evolução da contaminação das amostras, ao longo dos 20 dias de leitura da turbidez do meio de cultura, estão apresentadas na figura 6. Consegue-se perceber que a última amostra a apresentar extravasamento ocorreu no 17º dia e, após este período observou-se um platô. Esse resultado é interessante, pois destoa de achados de alguns autores que realizaram estudos similares por período menor que 17 dias (JANSEN; CONRADS; RICHTER, 1997; PIATELLI *et al.*, 2001; AMARAL, 2003; CRAVINHOS, 2003 e DIBART *et al.*, 2005), configurando a possibilidade de que os micro-organismos mantenham-se viáveis, *in vivo*, na interface por períodos até maiores que os observados.

5.2.1. ANÁLISE DA MICRO-FENDA EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Todas as amostras foram analisadas em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) onde se mensurou o tamanho da micro-fenda formada entre o implante osseointegrado e o respectivo conector protético. O quadro 7 apresenta a média dos valores observados nos grupos estudados.

QUADRO 7: Análise do espaço entre implante e conector protético através de microscopia eletrônica de varredura.

Amostra	Média da maior distância (µm)	Média da menor distância (µm)	Média geral da fenda formada (µm)
H.I.	11,05	0,69	5,87
H.E.	3,9	0,43	2,16
Valor <i>p</i>	< 0,05*	N/S	

NOTA: H.I.: Conexão protética Hexágono Interno. H.E.: Conexão protética Hexágono Externo. N/S: Valor *p* não significativo. (*): $p=0,027$. FONTE: O autor (2010).

Observou-se uma positividade entre as médias da fenda formada e a qualidade de infiltração bacteriana, ou seja, quanto maior a micro-fenda, maior a porcentagem de contaminação e menor o tempo para que esta acontecesse. Entretanto, não é lícito estabelecer correlação entre as médias gerais e da menor distância com os outros fatores analisados, pois todas elas apresentaram valor estatisticamente insignificante. Esta correlação pode ser feita somente levando em consideração a média da maior distância ($p < 0,05$) (QUADRO 7 e FIGURA 7). Portanto, pode-se estabelecer que as maiores distâncias da micro-fenda observadas por MEV, em ambos os sistemas de implante Hexágono Interno e Hexágono Externo, podem estar relacionadas com o maior número de peças HI que apresentaram infiltração bacteriana, dentro do número limitado de amostras utilizadas. Ou seja, a medida que a desaptação diminuiu, menor foi a infiltração bacteriana observada.

Além disso, foi realizada outra análise para o cruzamento de todos os dados obtidos, que possibilitou a verificar a correlação estatística entre a concentração do extravasado bacteriano com a média das menores micro-fendas observadas nas peças implantares HI (FIGURA 9), esta correlação não se repetiu nos outros fatores analisados. Alguns autores compararam o tamanho dos espaços e a proporção de contaminação (JANSEN; CONRADS; RICHTER, 1997; AMARAL, 2003). Nenhum deles encontrou relação estatisticamente significativa entre o tamanho destes espaços (médias) e a proporção de infiltração bacteriana.

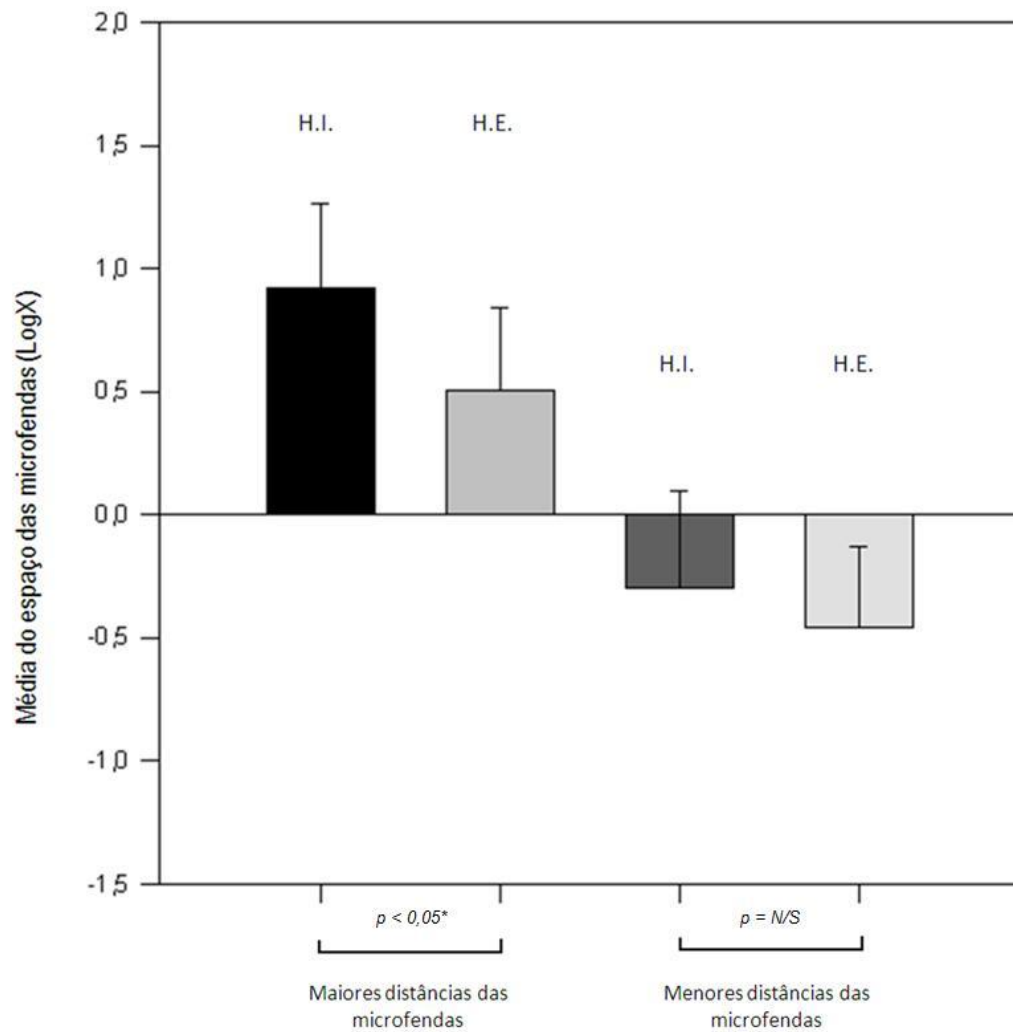


FIGURA 7: Gráfico mostrando as médias dos espaços formados entre o implante/conector nos modelos estudados.

NOTA: Os valores absolutos em micrômetros (μm) foram transformados em LogX para análise estatística. (*): Valor $p = 0,027$. N/S: Valor p não significativo. H.I.: Modelo de implante hexágono interno. H.E.: Modelo de implante hexágono externo. FONTE: O autor (2010).

As distâncias da micro-fenda formada entre implante/conector foram descritas por alguns autores como DELLOW, DRIESSEN e NEL (1997) que encontraram valores de desaptação que variaram de 0 a 7,15 μ m em sistemas de implantes Brånemark, enquanto AMARAL (2003) apresentou valores médios de desadaptação entre 6,5 μ m e 13,4 μ m. TSUGE *et al.* (2008) relataram média de distâncias do micro-fenda entre 2.3 μ m a 5.6 μ m. Já BONDAN *et al.* (2009) avaliaram a adaptação entre implantes pilares UCLA usinados e fundidos, encontrando valores de *gap* entre 2.15 μ m e 14.91 μ m. Todos esses autores realizaram estudos estáticos, ou seja, as peças implantares não exerceram função clínica, diferente de CALLAN *et al.* (1998), que analisaram 45 peças de implantes perdidos, que haviam sido utilizados clinicamente e encontraram valores médios de desaptação entre 30 a 135 μ m. Este dado pode sugerir que as distâncias reais entre os implantes e seus conectores pode ser maior ou aumentar durante o recebimento de forças no funcionamento dos mesmos. No presente estudo, a mensuração da micro-fenda variou de 0,69 μ m a 11,05 μ m nas peças de conformação hexagonal interna, e 0,43 μ m a 3,9 μ m. Sendo que a média geral de todas as peças analisadas ficou entre 2,16 μ m e 5,87. Portanto, consegue-se perceber que os resultados obtidos encontram-se dentro dos valores descritos na literatura, portanto foram consistentes com estudos anteriores apresentados. A figura 8 ilustra exemplos do perfil de mensuração da micro-fenda implante/conector.

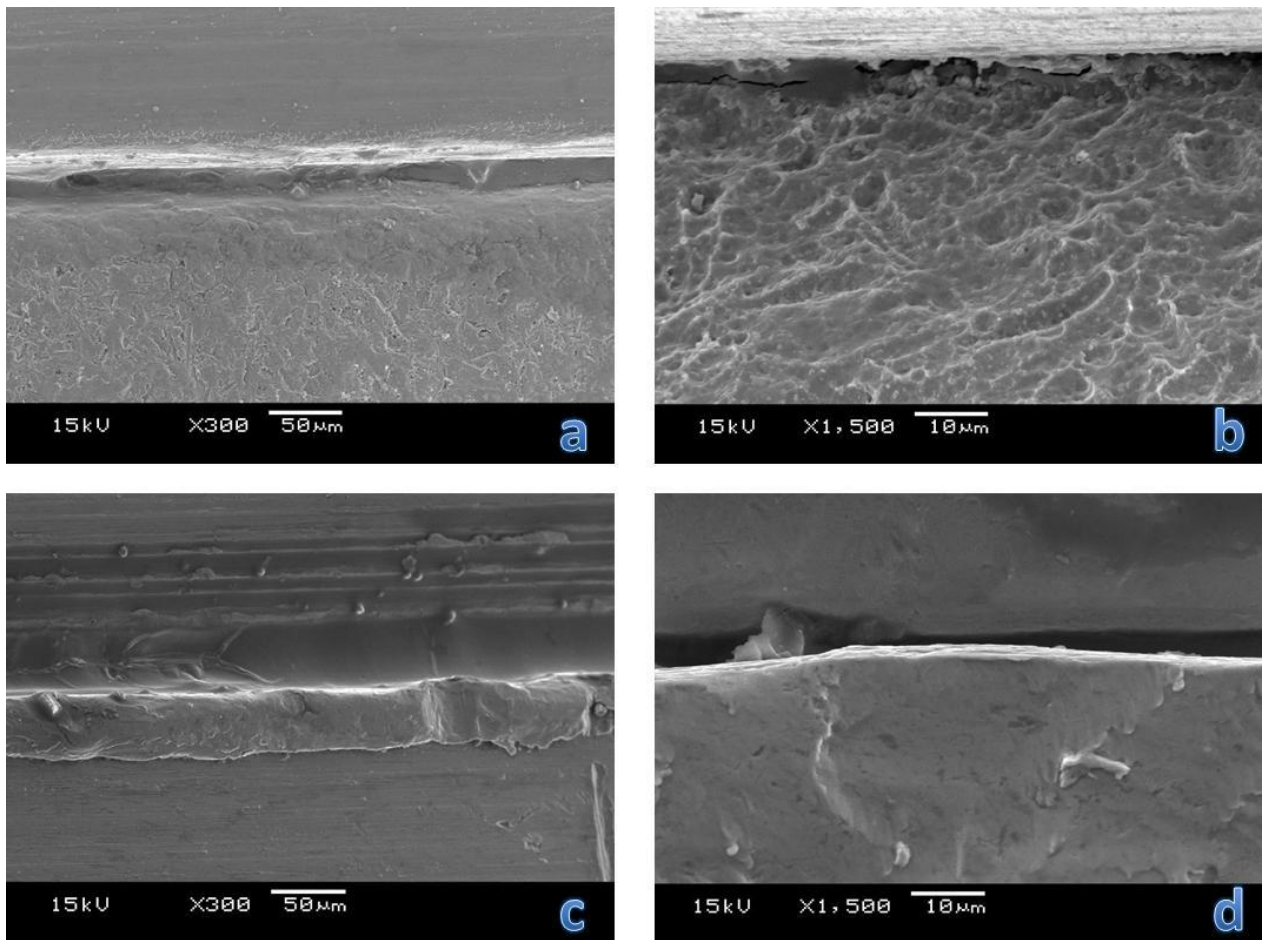


FIGURA 8: Padrão de mensuração do espaço entre implante e conector protético.

NOTA: a) Conexão hexagonal interna (H.I.) 5,0 x 7,0 SYSTHEX® em aumento de 300X. Justaposição do implante/conector formando um espaço ínfimo; um aumento da mesma peça revelou o valor de 0,27µm. b) H.I. 5,0 x 10,0 SYSTHEX® em aumento de 1500X. Espaço com cerca de 0,22µm. c) Conexão hexagonal externa (H.E.) 5,0 x 8,5 SYSTHEX® em aumento de 300X. Praticamente não se observa micro-fenda. d) H.E. 5,0 x 8,5 SYSTHEX® em aumento de 1500x. Espaço com cerca de 3,26µm. FONTE: O autor (2010).

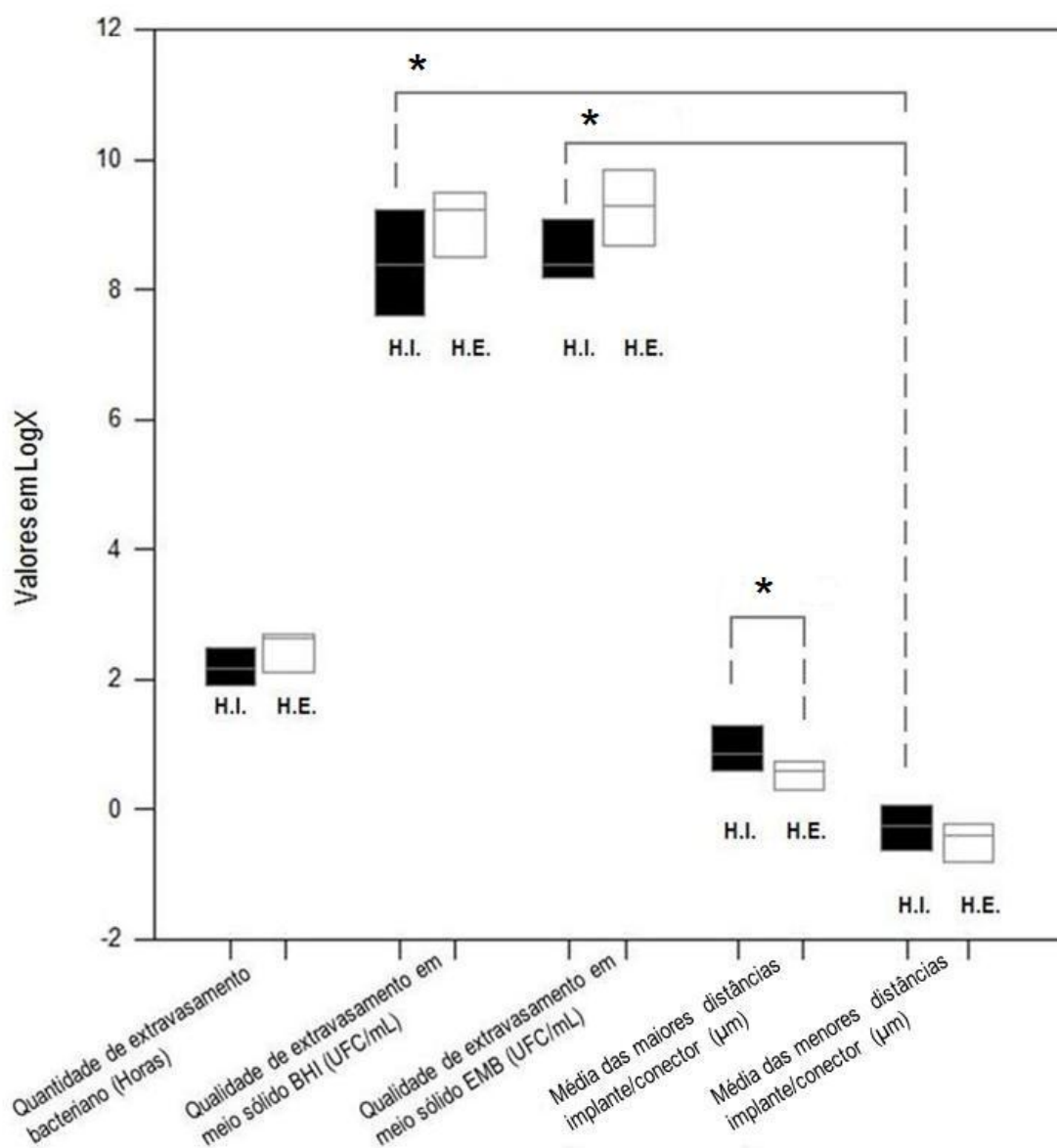


FIGURA 9: Box Plot mostrando análise estatística ANOVA on Ranks com pós teste de Tukey.

NOTA: Os valores absolutos foram transformados em LogX para análise. HI: Conexão hexagonal interna. HE: Conexão hexagonal externa. (*): Valor $p < 0,05$. FONTE: O autor (2010).

6 CONCLUSÕES

- A vedação nos sistemas de implantes avaliados, não impede a ocorrência de infiltração bacteriana.
- Houve correlação significativa entre a média das maiores distâncias na interface implante/conector protético entre os dois sistemas de implante estudados, bem como entre a média das menores distâncias e o extravasamento bacteriano somente nos implantes Hexágono Interno. Indicando a importância do espaço da micro-fenda nos conjuntos implante/conector.
- O melhor sistema de selamento entre os estudados, em relação à infiltração bacteriana, parece ser a conformação Hexágono Externo, segundo os dados gerados pelas análises da marca comercial SYSTHEX®, no modelo de estudo estático utilizado.
- A linhagem biologicamente mais adequada para o estudo foi o micro-organismo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
- O modelo de estudo para verificar a infiltração microbiana mostrou-se de fácil manipulação e utilização, sendo reproduzível em qualquer prática laboratorial.

REFERÊNCIAS

ABU-TA'A, M.; QUIRYNEN, M.; TEUGHEL, W.; VAN STEENBERGHE, D. Asepsis during periodontal surgery involving oral implants and the usefulness of peri-operative antibiotics: a prospective, randomized, controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v.35, p.58–63, 2008.

AGUIAR, A. A.; **Avaliação da microbiota bucal em pacientes sob uso crônico de penicilina G benzatina**. São Paulo, 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina.

ALBREKTSSON, T., BRÅNEMARK, P. -I., HANSSON, H. -A. and LINDSTRÖM, J.; Osseointegrated Titanium Implants: Requirements for Ensuring a Long-Lasting, Direct Bone-to-Implant Anchorage in Man', **Acta Orthopaedica**, 52: 2, 155- 170, 1981.

ALMEIDA PF, FRANCA MP, SANTOS SP, MOREIRA RS, TUNES UR. Microbiota estreptocócica associada com a formação inicial da placa dental. **R Ci Med Biol.**, v.1, n.1 p.33-41. 2002.

ALVES, A C. B. **A Análise da diversidade genética de *Prevotella intermedia* em indivíduos com doença periodontal**. Piracicaba, 2003. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

ALVES, M. F. R.; **DETECÇÃO DE *Actinobacillus actinomycetemcomitans* EM SÍTIOS PERI-IMPLANTARES**. Taubaté, 2006. Dissertação de mestrado, Universidade de Taubaté.

AMARAL, J. I. Q.; **ANÁLISE *IN VITRO* DA INFILTRAÇÃO BACTERIANA E DAS DESADAPTAÇÕES NA INTERFACE IMPLANTE/CONECTOR PROTÉTICO EM CINCO SISTEMAS DE IMPLANTES ENDÓSSEOS**. Piracicaba, 2003. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

ASHIMOTO, A. *et al.* Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal

pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions.

Microbiol. Immunol., Tokyo, v.11, n.4, p.266-273, Aug. 1996.

BARBIERI, D. S. V.; **ANÁLISE DA ADERÊNCIA “IN VITRO” DE *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* NA SUPERFÍCIE DENTÁRIA.** Curitiba, 2005.

Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná.

BECKER, W.; BECKER, B.; NEWMAN, M.; NYMAN, S. **Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure.** *J Oral Maxillofac Implants*, n.5, p.31-38. 1990.

BESIMO, C. E.; GUINDY, J. S.; LEWETAG, D.; MEYER, J. Prevention of Bacterial Leakage into and from Prefabricated Screw-Retained Crowns on Implants in Vitro. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.14, n.5, p.654-660, 1999.

BONDAN, J.L.; OSHIMA, H. M. S.; SEGUNDO, R. M. H.; SHINKAI, R. S. A.; MOTA, E. G.; MEYER, K. R. M. MARGINAL FIT ANALYSIS OF PREMACHINED AND CASTABLE UCLA ABUTMENTS. **Acta Odontol. Latinoam**, v. 22, n.2, p.139-142, 2009.

BRÅNEMARK, P. I.; ADELL, R.; BREINE, U.; HANSON, B. O.; LINDSTRÖM, J.; OHLSSON, Å. Intra-osseous anchorage of dental prostheses I. Experimental studies. **Scandinavian Journal of Plastic Reconstructive Surgery**, Stockholm, v.3, p. 81-100, 1969.

BROGGINI, M.; MCMANUS, L. M.; HERMANN, J. S.; MEDINA, R.; SCHENK, R. K.; BUSER, D.; COCHRAN, D. R. Peri-implant Inflammation Defined by the Implant-Abutment Interface. **J Dent Res**, v.85, n.5, p.4 73-478, 2006.

CALLAN, D.P.; O'MAHONY, A.; COBB, C.M. Loss of crestal bone around dental implants: a retrospective study. **Implant Dent**, Baltimore, v.7, n.4, p.258-266, 1998.

CARLSSON, L.; ROSTLUND, T.; ALBREKTSSON, B.; ALBREKTSSON, B.; BRÅNEMARK, P. I. Osseointegration of titanium implants. **Acta Orthop Scand** n.57, p.285-289, 1986.

COSTERTON, J. W. ; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Microbes, Immunity , and Disease**. v.284, p.1318-1322, 1999.

CRAVINHOS, J.C. P.; **ANÁLISE IN VITRO DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA NA INTERFACE IMPLANTE/CONECTOR PROTÉTICO EM TRÊS SISTEMAS DE IMPLANTES ENDÓSSEOS**. Piracicaba, 2003. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

DELLOW, A.G.; DRIESSEN, C.H.; NEL, H.J.C. Scanning electron microscopy evaluation of the interfacial fit interchanged components of four dental implant systems. **Int J Prosthodont**, Lombard, v.10, n.3, p.216-221, 1997.

DIBART, S.; WARBINGTON, M.; FAN SU, M.; SKOBE, Z. In Vitro Evaluation of the Implant-Abutment Bacterial Seal: The Locking Taper System. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.20, n.5, p.732-737, 2005.

DUNCAN, M. J. Oral microbiology and genomics. **Periodontology 2000**, v. 38, p.63–71. 2005.

DYKE, T. E. V. Control of inflammation and Periodontitis. **Periodontology 2000**, v.45, p.158–166. 2007.

FINE, D. H.; KAPLAN, J. B.; KACHLANY, S. C.; SCHREINER, H. C. How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a model for infectious diseases. **Periodontology 2000**, v. 42, p. 114–157. 2006.

FRANDSEN EV, PEDRAZZOLI V, KILIAN M. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. **Oral Microbiol Immunol**, v.6, n.3, p.129-33. 1991.

FRITZ, M. E.; Two-Stage Implant Systems. **Adv Dent Res**, v.13, p.162-169, 1999.

GASPARETTO, A.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; AVILA-CAMPOS, M. J. Aderência de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* às células epiteliais bucais: estabilidade e aspectos ultra-estruturais. **Pesqui Odontol Bras**, v. 14, n. 4, p. 311-318. 2000.

GERBER, J.; WENAWESER, D.; HEITZ-MAYFIELD, L.; LANG, N. P.; PERSSON, G. R. Comparison of bacterial plaque samples from titanium implant and tooth surfaces by different methods. **Clin. Oral Impl. Res**, v.17, p.1-7, 2006.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A. Selective medium for *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral Biol.**, v.18, p.1357-1364, 1973.

GROSS, M.; ABRAMOVICH, I.; WEISS, E. I. Microleakage at the Abutment-Implant Interface of Osseointegrated Implants: A Comparative Study. **INT J ORAL MAXILLOFAC IMPLANTS**, V.14, P.94–100. 1999.

HERZBERG, M.C. Oral Streptococci in Health and Disease. In: Stevens D. L., Kaplan E. L., editors. **Streptococcal Infections**: clinical aspects, 65 microbiology and molecular pathogenesis. 1st ed. New York: Oxford Universe Press.. p. 333-70. ; 2000.

JANSEN, V.K.; CONRADS, G.; RICHTER, E.J. Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.12 n.4, p.527-540, 1997.

JORGE, A. O. C. **Microbiologia Bucal**. São Paulo: Livraria Santos Editora, p. 89, 1995.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. **Diagnóstico microbiológico- 5a ed.** MEDSI-Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro-RJ, 2001.

LEE, K.H.; MAIDEN, M.J.F.; WEBER, H.P. Successful osseointegrated dental implants, **J Periodontol**. v.70, p.131-138, 1999.

LEONHARDT, A.; BERGSTROM, C.; LEKHOLM, U.; Microbiologic Diagnostics at Titanium Implants. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v.5, n.4, p. 226-232, 2003.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4ºed, 2005.

MANSUR, M. E. C.; **PRESENÇA DE *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* EM SULCO PERI-IMPLANTAR E SALIVA DE PACIENTES PORTADORES DE PRÓTESE SOBRE IMPLANTES SAUDÁVEIS COM E SEM A PRESENÇA DE DENTES NATURAIS.** Ponta Grossa, 2008. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa.

MARSH, P. D.; Microbial Ecology of Dental Plaque and its Significance in Health and Disease. **Adv. Dent. Res.** v.8, n.2, p.263-271, 1994.

MEFFERT, R. M. PERIODONTITIS VS. PERIMPLANTITIS: THE SAME DISEASE? THE SAME TREATMENT? **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 7, n.3, p.278-291. 1996.

MURRAY, P. R. **Manual of clinical microbiology.** Washington. 2007.

NEIVA, I. F.; **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BIOSOROTIPOS SELVAGENS DE *Streptococcus mutans* ISOLADOS DE CRIANÇAS COM DIFERENTES HISTÓRICOS DA DOENÇA CÁRIE.** Curitiba, 2007. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná.

NISHIHARA, T.; KOSEKI, T.; Microbial etiology of Periodontitis. **Periodontology** 2000, V. 36, P. 14–26, 2004.

NORSKOV-LAURITSEN, N.; KILIAN, M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* e *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb., nov. and *Aggregatibacter segnis* com. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 56, p. 2135-2146. 2006

PEARCE, C. *et al.* Identification of pioneer viridians streptococci in the oral cavity of human neonates. **J. Med. Microbiol.**, n. 42, p. 67-72, 1995.

PIATELLI, A.; SCARANO, A.; PAOLANTONIO, M.; ASSENZA, B.; LEGHISSA, G. C.; BONAVENTURA, G. D.; CATAMO, G.; PICCOLOMINI, R. Fluids and microbial penetration in the internal part of cement-retained versus screw-retained implant-abutment connections. **J Periodontol**, v.72, p. 1146-1150, 2001.

QUIRYNEN M, VOGELS R, PEETERS W, VAN STEENBERGHE D, NAERT I, HAFFAJEE A. Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. **Clin. Oral Impl. Res.**, v.17, p.25–37. 2006.

RAUTEMAA, R.; LAUHIO, A.; CULLINAN, M. P.; SEYMOUR, G. J. Oral infections and systemic disease—an emerging problem in medicine. **Clin Microbiol Infect**, v. 13, p1041–1047. 2007.

RIMONDINI, L.; MARIN, C.; BRUNELLA, F.; FINI, M. Internal Contamination of a 2-Component Implant System After Occlusal Loading and Provisionally Luted Reconstruction With or Without a Washer Device. **J Periodontol**, v. 72, n. 12, p.1652-1657, 2001.

RENVERT, S.; LINDAHL, C.; RENVERT, H.; PERSSON, G. R. Clinical and microbiological analysis of subjects treated with Bra°nemark or AstraTech implants: a 7-year follow-up study. **Clin. Oral Impl. Res.**, v.19, 2008; 342–347.

SLOTS, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease: introduction. **Periodontology 2000**, v. 20, p.7-13. 1999.

SMITH, D. J. *et al.* Oral streptococcal colonization of infants. **Oral Microbiol. Immunol.**, n. 8, p. 1-4, 1993.

SOBRINHO, A.S. Flora Normal da Cavidade Oral e Mecanismos de Defesa do Hospedeiro. **Rev Ass Paul Cirurg Dent.**, v.37, n.2, p.108-15. 1983.

SOCRANSKY, S.S., SMITH, C., MARTIN, L., PASTER, B.J., DEWHIRST, F.E. & LEVIN, A.E. Checkerboard DNA–DNA hybridization. **Biotechniques** 17: 788–792. 1994.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. **Periodontology 2000**. v.38, p. 135-187. 2005.

SOUTHAM, J. C., CHIR, B. & SELWYN, P.; Structural changes around screws used in the treatment of fractured human mandibles. **Brit. J. Oral. Surg.** V.8, p.21 1-22 1, 1970.

STEINEBRUNNER, L.; WOLFART, S.; BÖßMANN, K.; KERN, M. In Vitro Evaluation of Bacterial Leakage Along the Implant-Abutment Interface of Different Implant Systems. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.20, n.6, p. 875-881, 2005.

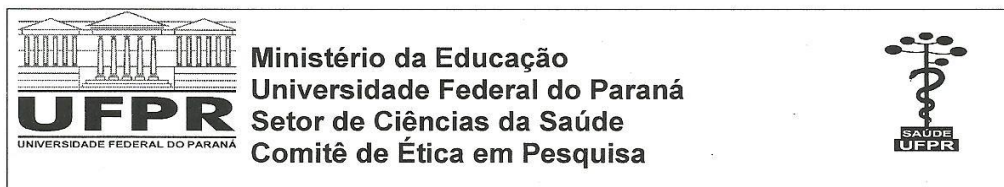
TAPPUNI, A. R.; S. J. CHALLACOMBE. Distribution and isolation frequency of eight streptococcal species in saliva from predentate and dentate children and adults. **J. Dent. Res.**, n. 72, p. 31-36, 1993.

TSUGE, T.; HAGIWARA, Y; MATSUMURA, H. Marginal Fit and Microgaps of Implant-abutment Interface with Internal Anti-rotation Configuration. **Dental Materials Journal**, v.27, n.1, p.29—34, 2008.

WARD, B. B.; TERRELL, J. E.; COLLINS, J. K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sinusitis Associated With Sinus Lift Bone Grafting and Dental Implants: A Case Report. **J Oral Maxillofac Surg.** v.66, p.231-234, 2008.

APÊNDICES

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Curitiba, 27 de março de 2009.

Ilmo (a) Sr. (a)
Eduardo Luis Zardo

Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Avaliação *in vitro* do selamento bacteriano em três diferentes sistemas de implantes dentários**” está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 11 de fevereiro de 2009 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 24 de março de 2009.

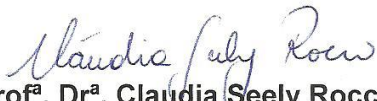
Registro **CEP/SD**: 672.007.09.01

CAAE: 0002.0.091.000-09

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 24/09/2009.

Atenciosamente


Prof.ª Dr.ª Claudia Seely Rocco
Secretária do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E
PATOLOGIA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Curitiba, de de 2009.

- Você, paciente dos serviços odontológicos desta Universidade, está sendo convidado a participar de um estudo intitulado "AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INFILTRAÇÃO BACTERIANA EM DIFERENTES SISTEMAS DE VEDAÇÃO EM IMPLANTES DENTÁRIOS". É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços importantes em todas as áreas, e sua participação é fundamental.
- O objetivo desta pesquisa é coletar bactérias para verificar em laboratório se elas são capazes de extravasar o selamento de implantes dentários.
- Caso você participe da pesquisa, será necessário fazer exame clínico e coleta de bactérias localizadas nas regiões de sulco gengival; bem como exame radiográfico caso ainda não tenha sido feito na clínica de periodontia.
- Como em qualquer tratamento, você poderá experimentar algum desconforto, principalmente relacionado ao exame clínico e coleta de fluido gengival através de pontas de papel.
- Os riscos que envolvem o seu atendimento para a coleta são unicamente relacionados a algum possível desconforto durante a coleta.
- Você deverá comparecer na clínica odontológica para a coleta a ser realizada somente uma vez antes de iniciar o seu tratamento na periodontia desta Universidade.
- Contudo, os benefícios esperados são a verificação dos microrganismos presentes, o que pode auxiliar no diagnóstico e tratamento.
- O pesquisador e cirurgião-dentista **Eduardo Luis Zardo**, aluno de mestrado na UFPR, poderá ser contatado pelo telefone **3361-1573** ou email **du@ufpr.br**, é o responsável pelo seu atendimento e poderá esclarecer eventuais dúvidas a respeito desta pesquisa.
- Estão garantidas todas as informações que você queira, antes durante e depois do estudo.
- A sua participação neste estudo é voluntária. Contudo, se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá solicitar de volta o termo de consentimento livre esclarecido assinado.
- As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos profissionais que executam a pesquisa e pelas autoridades legais. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **confidencialidade** seja mantida.
- Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames clínicos e radiográficos) não são da sua responsabilidade.

- Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que qualquer problema decorrente do estudo será tratado na clínica de odontologia da UFPR.
- Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)
Identificação do Responsável